

**MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI**

**ÁLLATOK ÁLTAL HORDOZOTT VÍRUSOK DIVERZITÁSÁNAK VIZSGÁLATA  
MOLEKULÁRIS BIOLÓGIAI, IMMUNOLÓGIAI ÉS KLASSZIKUS VIROLÓGIAI  
MÓDSZEREK ALKALMAZÁSÁVAL**

**DR. JAKAB FERENC**



**PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM  
TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR  
BIOLÓGIAI INTÉZET**

**PÉCS, 2018**

## A DOKTORI MŰ ÖSSZEFOGLALÓJÁBAN SZEREPLŐ VÍRUSOK ÉS ÁLLATFAJOK RÖVIDÍTÉSEINEK JEGYZÉKE

BtAstV	denevérek által terjesztett astrovírusok
BtBV	denevérek által terjesztett bufavírus
BtCalV	denevérek által terjesztett calicivírusok
BtCoV	denevérek által terjesztett koronavírusok
BtPV	denevérek által terjesztett pikornavírusok
DOBV	Dobrava hantavírus
KEV	kullancsenkefalitisz vírus
KKVLV	Krími-kongói vérzések láz vírusa
LLOV	Lloviu vírus
PUUV	Puumala hantavírus
TULV	Tula hantavírus
USUV	Usutu vírus
WNV	Nyugat-nílusi vírus (West Nile vírus)

AAG	<i>Apodemus agrarius</i> (pirók erdei egér)
AFL	<i>Apodemus flavicollis</i> (sárganyakú erdei egér)
MAR	<i>Microtus arvalis</i> (mezei pocok)
MGL	<i>Myodes glareolus</i> (vöröshátú erdei pocok)

## BEVEZETÉS

A XXI. század számos új kihívást támasztott az emberiség elé, amelyek közül talán az egyik legnagyobb az emberiségre veszélyt jelentős kórokozókkal vívott harc. A globalizációs folyamatok, a világméretű kereskedelem, a népességrobbanás vagy éppen a korlátlan utazási lehetőségek mind hozzájárulhatnak a fertőző betegségek határtalan, emberi erővel szinte megállíthatatlan terjedéséhez, lehetőségeket biztosítva ezzel újabb és újabb járványok kialakulására. A folyamat, ami járványok kirobbanásához és futótűzszerű terjedéséhez vezet nem volt példanélküli az elmúlt évtizedekben sem. Gondoljunk csak a 2002-es SARS koronavírus járványra, vagy a 2009-ben megjelent négyszeres reasszortáns H1N1 pandémiás influenzavírusra. Az emberi civilizáció terjedésével, a modern kor technológiai találmányai és az életminőség javítása érdekében bevezetett vívmányai sokszor számos veszélyt is rejthetnek magukban. Európa egyik legforgalmasabb repülőterének számító frankfurti repülőtér 24 óra alatt több mint 167 ezer utas veszi igénybe, ami havi szinten több mint 5 millió utast jelent. A modern molekuláris biológiai technológiák lehetőséget nyújtanak a kórokozók gyors felismerésére, genetikai adataik gyors megismerésére, vagy akár ezidáig ismeretlen, egészségügyi kockázattal bíró patogének leírására is. Az új kórokozók folyamatos keresése, megismerése már széleskörűen elfogadott eljárás, egyre növekvő kutatási irány, amely a közegészségügy szempontjából kritikus jelentőségű helyzetek megelőzését teheti lehetővé. Jó példa erre az elmúlt években egyre gyakoribb és súlyosabb járványokat okozó filovírusok kutatása. A 2013 és 2016 között tomboló nyugat-afrikai ebolavírus járvány a modern kor legsúlyosabb epidémiája volt, de egyúttal a történelem legjobban feltárt járványa is, hiszen a megbetegedések 5 százalékából sikerült teljes virális genomikai adatot nyerni. Hasonló méretű és kimenetelű járványok megelőzésének egyik alkalmas módszere lehet a vírusok időben történő felfedezése, melyre ugyancsak jó példa a nemrégiben leírásra került Bombali ebolavírus, amelyet Sierra Leone területén befogott denevérekben azonosítottak. Azonban a felbukkanó és/vagy újra felbukkanó fertőző betegségek megismeréséhez komplex megközelítések szükségesek, így legalább annyira fontos a természetes gazdaszervezetek és vektorszervezetek megismerése, mint a kórokozó direkt genomikai vizsgálata.

Jelen disszertációban a hazánkban és a környező országokban előforduló állatok, elsősorban rágcsálók, szúnyogok, kullancsok és denevérek által hordozott virális kórokozókat mutatom be. A munka jelentős mértékben támaszkodik a már ismert, illetve új vírusok azonosításának fontosságára, molekuláris jellemezésükre, terjedésük dinamikájának feltárására és gazdaszervezeteik megismerésére.

## CÉLKITŰZÉSEK

Vizsgálataink elsődleges célja a hazánkban, illetve a régióban előforduló, állatok által hordozott vírusok jellemzése volt. Elsősorban olyan vírusokra összpontosítottunk, amelyeknek jelentős szerepe van /lehet humán- és/vagy állategészségügyi, közegészségügyi és járványügyi szempontból. Ennek megfelelően vizsgálatainkat főleg a természetben gyakran előforduló rágcsálók, szúnyogok és kullancsok által hordozott vírusok felmérésére irányítottuk, illetve a későbbiekben egy napjainkban egyre növekvő tendenciát mutató kutatási irányt, a denevérek által hordozott vírusok körét vontuk be. Módszertani palettánk részeként elsősorban molekuláris biológiai technikákat hívtunk segítségül, de jelentős hangsúlyt fektettünk az immunológiai és hagyományos virológiai metodikák alkalmazására is. Mivel sok esetben új, ismeretlen kórokozók felderítése és molekuláris jellemzése volt a fő cél, ezen kísérleteinkben kutatási stratégiánkat elsősorban metagenomikai megközelítéseken alapuló technikák határozták meg.

Céljaink voltak:

- A hazai **hantavírusok** komplex vizsgálata, amely magába foglalta a molekuláris biológiai, klinikai és epidemiológiai ismereteink bővülését a vírussal kapcsolatban.
- A **kullancsenkefalitisz vírus** hazai kimutatása rágcsálókból és a vektor szervezetekből egyaránt. A kimutatott vírusok filogenetikai, filogeográfiai besorolása.
- A **Krími-kongói vérzések láz vírus** hazai vizsgálata, a vírus tényleges jelenlétének igazolása (vagy cáfolása) molekuláris biológiai és szerológiai technikák alkalmazásával.
- A **Nyugat-nílusi vírus** hazai és régiós szintű kimutatása, valamint sokrétű molekuláris biológiai jellemzése, filogenetikai analízise.
- Az **Usutu vírus** régiós kimutatása, filogenetikai besorolása.
- A **denevérek által hordozott vírusok** esetében a korszerű molekuláris biológiai módszerek nyújtotta lehetőségeket kihasználva új vírusok leírását céloztuk meg, amely így együtt járt a vírusok részleges vagy teljes genomjának meghatározásával. Ennek segítségével feltérképezhetővé váltak a vírusok evolúciós szintű változásai, jellemezhetők filogenetikai, filogeográfiai kapcsolataik, vagy akár megismerhetők a virális fehérjék struktúrái és azok feltételezett funkcionális szerepe. Fontos kérdésünk volt a vírusok tényleges gazdafajainak megismerése, és ezáltal a fajok közti átadás lehetőségének, a lehetséges állategészségügyi kockázatnak, vagy akár a potenciális zoonótikus képességnek a felmérése is.

## ANYAGOK és MÓDSZEREK

### Vizsgálati minták gyűjtése

#### ➤ *Rágcsáló minták gyűjtése*

A kisemlősöket hazai és horvátországi határmenti területeken csapdáztuk. Kísérleteinkben a rágcsálók tüdőszövetében szaporodó vírusokat kerestük, így természetesen a vizsgálataink tárgyát képező kisemlősök boncolása elengedhetetlen volt. A vizsgálatokhoz tüdő, máj, lép, vese, bél és agy szöveteket távolítottunk el.

#### ➤ *Ízeltlábú vektorok (kullancsok, szúnyogok) gyűjtése*

Kullancsok esetében a gyakorlatban igen elterjedt, legegyszerűbb, kézi gyűjtési módszert alkalmaztuk, melynek során egy hagyományos törölköző segítségével sikerült összegyűjteni az állatokat az aljnövényzetről. A csípőszúnyogok (*Culicidae*) gyűjtése CDC-CO<sub>2</sub> csapdákkal történt, minden esetben a szúnyogok aktív tenyészidőszakában (május-szeptember).

#### ➤ *Humán vérminták gyűjtése*

A hantavírusok okozta fertőzések klinikai vizsgálatához a humán betegmintákat a PTE, Klinikai Központ, I. számú Belgyógyászati Klinika, Infektológiai Tanszék, illetve a II. számú Belgyógyászati Klinika és Nephrológiai Centrum munkatársainak segítségével gyűjtöttük. A humán érintettségű hantavírus vizsgálatok másik nagy célcsoportja a fertőzésnek leginkább kitett rizikócsoport (erdészek, vadászok, mezőgazdasági dolgozók) volt. A vizsgálatok etikai engedély száma: ETT-TUKEB No#2213-0/2010-1018EKU.

### Molekuláris biológiai módszerek

#### ➤ *Nukleinsav preparálás*

A virális nukleinsav preparálását mindig az adott kísérlethez igazítva végeztük el. A legtöbb vizsgálatnál a kereskedelmi forgalomban is kapható nukleinsav izoláló kitéket használtuk, minden esetben betartva a gyártó által előírt paramétereket. Abban az esetben, ha a kísérlet megkövetelt más jellegű nukleinsav izolálást, leggyakrabban a TRIzol alapú módszert, vagy a hagyományos, guanidin-thiocianát-silica extrakciós technikát alkalmaztuk.

#### ➤ *RT-PCR, qRT-PCR vizsgálatok (TaqMan próba)*

Mivel a vizsgált kórokozók a kísérletek jelentős részében RNS vírusok voltak, leggyakrabban egy lépéses (one-step) reverz transzkripcióspolimeráz láncreakciót (RT-PCR) alkalmaztunk, mind a hagyományos végpont RT-PCR, mind pedig a TaqMan próbás RT-PCR során (Qiagen, One Step RT-PCR Kit). A három kilobázisnál hosszabb nukleotid szakaszok

felsokszorozásának céljából Phusion U Hot Start PCR Master Mix (Thermo Scientific), valamint SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen) enzimeket használtunk.

➤ *RACE PCR*

A 3' genomi végek meghatározása céljából a 3' RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) módszert alkalmaztuk. A kísérlethez a Superscript III One-Step RT-PCR System (Invitrogen) rendszert használtuk, a gyártó által javasolt előírásokat és javaslatokat követve. A genom 5' végének meghatározását az 5'/3' RACE Kit, 2<sup>nd</sup> Generation Kit (Roche) segítségével végeztük.

➤ *Hagyományos, Sanger-féle szekvenálás*

A szekvenálási reakcióhoz szükséges RT-PCR termékeket kereskedelmi forgalomban kapható kitek segítségével tisztítottuk ki az agaróz gélből, a gyártó utasításai alapján. A szekvenálási reakciót BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v1.1 (Thermo Fisher Scientific) alkalmazásával, a kísérlet jellegétől függő oligonukleotid primerekkel végeztük el. A szekvenálást automata ABI Prism 310 DNS szekvenáló készülékkel (Applied Biosystems) valósítottuk meg.

➤ *NGS alapú szekvenálás*

Kísérleteink bizonyos szakaszában újgenerációs szekvenálást (NGS) is alkalmaztunk. Az Ion Torrent PGM (Life Technologies) kompatibilis szekvenálási könyvtárakat a NEBNext Fast DNA Fragmentation & Library Prep Set for Ion Torrent Kit (New England Biolabs) használatával készítettük el. A könyvtárkészítés során az IonTorrent Xpress barcode adapterei (Life Technologies) kerültek felhasználásra. A klonális fragment amplifikációt elvégző emulziós PCR reakciókat az Ion OneTouch 200 Template Kit felhasználásával, a OneTouch 2 (Life Technologies) platformon végeztük. A szekvenálásokhoz a 200 bázispáros szekvenálási protokollt alkalmaztuk, 316-os chip felhasználásával, Ion Torrent PGM platformon.

➤ *Klónozás, transzformálás, fehérje-expresszióhoz szükséges plazmidok előkészítése*

A kísérletek jelentős részében a könnyebb kezelhetőség miatt a PCR terméket közvetlenül TA-klónozó rendszerbe (pGEM-T Vector System; Promega) juttattuk be, majd a fragmentet pET28a(+) (Novagen) expressziós vektorba klónoztuk. A restrikciós endonukleáz emésztéseket kísérlettől függő kombinációban végeztük el (NdeI/XhoI, NheI/XhoI) (New England Biolabs) a megfelelő enzimpuffer jelenlétében 2 óráig 37 C°-on. A keletkezett termékeket agaróz gélelektroforézissel választottuk el, és a gélből tisztítottuk. A tisztított vektort ezután expressziós *E. coli* törzsbe, BL21 Rosetta (DE)pLysS (Novagen) kompetens sejtekbe transzformáltuk.

➤ *Rekombináns fehérje expresszió, fehérjetisztítás*

A rekombináns plazmidot tartalmazó BL21 Rosetta sejteket 37 °C-on, folyamatos rázatás mellett LB tápfolyadékban növesztettük kanamycin és kloramfenikol jelenlétében. A logaritmikus fázis elérésekor a sejtek indukcióját IPTG hozzáadásával indítottuk. A fehérje expressziót követően a sejtpelletet Bacterial Protein Extraction Reagent® (B-PER; Thermo Scientific) segítségével oldottuk fel a gyártó utasításai alapján. A zárványtesteket képző proteinek feltárásához denaturáló lízis puffert alkalmaztunk. A lízátumból az esetleges sejttörmelékcentrifugálással távolítottuk el. A rekombináns fehérjék tisztítása a sejtek feltárásához hasonlóan denaturáló körülmények között zajlott HIS Select® HF Nickel Affinity Gel (Sigma Aldrich) oszlop segítségével. A fehérjék renaturálását dialízissel végeztünk el. A fehérjék pontos méretét, tisztaságát és koncentrációját Protein LabChip® Kit segítségével Agilent 2100 Bioanalyzer készülék (Agilent Technologies) használatával állapítottuk meg a gyártó utasításai szerint.

➤ *Transzgenikus CHO sejt vonal előállítása*

Transzgenikus kínai hörcsög ovarium (CHO) sejteket a KKVLV vizsgálataink során használtunk, melyet lentivirális expressziós rendszer segítségével állítottunk elő HEK 293T sejtekben. A megcélzott CHO sejteket spinokulációval fertőztük.

## **Immunológiai módszerek**

➤ *Western blot (WB) vizsgálat*

A fehérjemintákat gélelektroforézis alkalmazásával, 10%-os SDS-poliakrilamid gélen választottuk el, majd elektroblottolással nitrocellulóz membránra (BioRad) juttattuk át, Semi-Dry Transfer készülék (BioRad) használatával. A vizsgálatokban alkalmazott elsődleges antitest jellegét és koncentrációját az adott kísérlet határozta meg, azonban a fehérjéken lévő His tag jelölésére minden esetben 1:1000 hígításban Penta-His monoklonális antitestet (Qiagen) használtunk. Másodlagos antitestként tormaperoxidáz (HRP) konjugált kecske anti-egér IgG (1:1000, Dako), illetve poliklonális anti-human IgG antitestet (1:2000, Dako) alkalmaztunk. A reakciót kromogén oldat, DAB-NiCl<sub>2</sub> (3, 3' diaminobenzidine; Sigma) és H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> segítségével tettük láthatóvá.

➤ *ELISA vizsgálat*

Standard, indirekt ELISA vizsgálatokat a hantavírus, illetve a KKVLV kísérletek során alkalmaztunk. A kísérletekben a 96 lyukú mikrotiter lemezeket (Maxisorp Nunc Immuno Plate, Nunc) és az általunk előzőekben expresszált rekombináns nukleokapszid proteint használtuk. A továbbiakban standard ELISA protokollt alkalmaztunk. A színreakciót 3,3',5,5'-

tertrametilbenzidin szubsztrát (TMB; BD Biosciences) hozzáadásával érték el, majd az enzimreakciót 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> oldattal állítottuk le. Az eredményeket mikrotiter-lemez spektrofotométerrel (Thermo Electron Corporation) 450 nm hullámhosszon mértük.

➤ *Immunfluoreszcens vizsgálat*

Kísérleteinkben a CHO-KKVLV transzfektált sejtvonalat metanolos fixálást követően tárgylemezre szárítottuk. A kísérletekben 1:100 hígítású nyúl savót, illetve kecske, anti-nyúl IgG Alexa Fluor 488 (Abcam) szekunder antitesteket alkalmaztunk. Az eredményeket Nikon Eclipse Ti-U mikroszkóp rendszerrel, 480 nm gerjesztési hullámhosszon értékeltük.

### **Vírusizolálási kísérletek**

Vizsgálataink során az izolálni kívánt vírustól függően számos állati és humán sejtvonalat használtunk. A legfontosabbak a következők voltak: Vero E6, HEK 293, A549, Tb1-Lu és C6/36. Az izolálási kísérleteket 25 cm<sup>2</sup>-es sejttenyésztő edényekben, 37°C-on 5% CO<sub>2</sub> jelenléte mellett, nedves környezetben végeztük. A sejtek fenntartásához 2% FBS és 5% Penicillin-Streptomycin tartalmú DMEM tápfolyadékot használtunk.

A zoonótikus potenciállal rendelkező vírusok esetében előfordulhat a laboratóriumi fertőzés is, ennek megfelelően minden izolációs kísérletet kizárólag 3-as, illetve 4-es biológiai biztonsági szinten (BSL-3 és BSL-4) végeztünk (ahol ez szükséges volt).

### **A molekuláris analízisek módszerei**

➤ *Filogenetikai analízis*

Az alapvető szekvencia szerkesztéseket és ellenőrzéseket GeneDoc 2.7-es verziójú szoftver segítségével végeztük. A nukleotid szekvenciákat a ClustalX 2.0 szoftverrel igazítottuk egymáshoz, amelyet követően a filogenetikai analízist a MEGA (v3.1, v5.0 és v6.0) programmal készítettük. Az automatikus modellkiválasztást a PhyML online verziójának Smart Model Selection funkciója segítségével valósítottuk meg.

➤ *Rekombináció analízis*

Kísérleteinkben a BtBV vizsgálatokban rekombináció analízist is végeztünk. A lehetséges rekombinációs események feltárása érdekében az általunk leírt vírusgenomot a SimPlot szoftver v3.5.1 verziójának használatával rekombináció analízisnek vetettük alá.

➤ *RNS másodlagos szerkezetének elemzése*

Az 5'-IRES és 3' UTR régiók másodlagos RNS szerkezetének meghatározásához manuális korrekciók alkalmazásával Mfold programot használtunk.



➤ *Polyprotein vágási helyek elemzése*

Az új, denevérek által hordozott pikornavírus poliprotein lehetséges vágási helyeinek meghatározásához és ellenőrzéséhez elsősorban a NetPicoRNA program predikcióit vettük figyelembe.

➤ *3.5.5 Fehérje modellezés*

Az érett víruskapszidok három dimenziós szerkezeti modelljeit az I-TASSER (Iterative Threading ASSEmbly Refinement) online elérhető automatikus modellépítő szerver segítségével hoztuk létre. A modelleket az újonnan azonosított vírusok aminosav szekvenciáinak felhasználásával állítottuk elő. A nyers fehérje modelleket a Schrödinger Suite MacroModel energia minimalizáló és geometria optimalizáló moduljával finomítottuk. Az aminosav szekvencia illesztéseket az SRS bioinformatikai szoftvercsomag NeedleP eszközével hajtottuk végre. A T=3 csonkolt ikozaéderes szerkezetű virion modelleket a VIPERdb Oligomer Generator alkalmazásával hoztuk létre. A molekula grafikát és a szekvencia összerendezés vizualizációját a VMD v1.9.1 molekulagrafikai szoftverrel, illetve a Schrödinger Suite Multiple Sequence Viewer alkalmazásával állítottuk elő.

## EREDMÉNYEK és MEGBESZÉLÉS

### Rágcsálók hordozta hantavírusok komplex hazai vizsgálata

#### ➤ *Rekombináns fehérje expresszió, ELISA vizsgálatok specificitása és szenzitivitása*

A rekombináns fehérjék sokrétű alkalmazásai lehetővé teszik az egyes laboratóriumok számára, hogy akár saját fejlesztésű szerológiai tesztet (ELISA, WB) használjanak vizsgálataikban. Annak érdekében, hogy mind a humán, mind pedig a kisemlősök vizsgálatát el tudjuk végezni nem csak a molekuláris biológiai, de szerológiai (antigén alapú) teszteket is optimalizálni kellett. A jelenleg kereskedelmi forgalomban kapható hantavírus szerológiai tesztek kísérleteinkhez nem voltak megfelelőek, mivel: i) kizárólag humán minták vizsgálatát teszik lehetővé, így a vadon élő állatok tesztelésére nem alkalmasak, ii) nem minden esetben specifikus az adott régióban cirkuláló hantavírusokra, hiszen a tesztek alapja más földrajzi területről gyűjtött vírustól kiinduló fehérje, iii) kutatási célra nem költséghatékonyak. Ennek megfelelően munkánk első lépéseként DOBV és PUUV rekombináns nukleokapszid fehérjét (rNP) állítottunk elő. A PAGE vizsgálatok egyértelműen mutatták, hogy DOBV esetében várakozásunknak megfelelően 45-50 kDa méretű, túltermelt fehérjét kaptunk, hozzávetőlegesen 0,5 mg/ml koncentrációban. A PUUV fehérje rNP 59 kDa méretűnek adódott, koncentráció mérés pedig 2 mg/ml értékeket mutatott. A rekombináns, virális antigének aktivitását, antigenitását WB módszerrel is ellenőriztük. A fehérjék N terminálisán lévő hisztidin (6xHis) motívumra specifikus monoklonális anti-6xHis antitestet és poliklonális anti-DOBV illetve anti-PUUV humán IgG antitesteket használtunk a kísérletekben. Mindkét vírus esetében megfelelő intenzitású jelet kaptunk, ami egyértelműen a fehérjék aktív immunológiai állapotára utalt. A WB analízisek eredményei alapján, megkezdhattuk az ELISA vizsgálatok optimalizálását is. Első lépésként meg kellett határoznunk ELISA tesztjeink specificitását és szenzitivitását. DOBV esetében a számolt specificitást 97,6%-ban, a szenzitivitást 88,8%-ban állapítottuk meg, míg a PUUV szenzitivitását 90,9%-ban, a specificitását pedig 95,2%-ban határoztuk meg.

#### ➤ *A DOBV kimutatása molekuláris biológiai és szerológiai módszerekkel*

A DOBV első szisztematikus hazai vizsgálatában összesen tíz minta esetén kaptunk pozitív eredményt. A tíz pozitív minta közül hármat *Apodemus agrarius*-ból (AAG), míg hetet *Apodemus flavicollis*-ból (AFL) mutattunk ki. A tíz pozitív mintából, nyolc esetben tudtuk a teljes NP gént (1290 bázispár) amplifikálni, szekvenálni és elemezni. Az AFL által hordozott DOBV esetében a filogenetikai vizsgálatok azt mutatták, hogy az egymáshoz földrajzilag közel eső területekről származó vírusok genetikai hasonlósága nagyobb, így a horvát, szlovén és

magyar törzsek vizsgálatainkban is egyértelműen elkülönültek egyéb európai, például a görögországi törzsektől. Az AAG által hordozott DOBV filogenetikai elemzéséből azonban jól látható, hogy a csoporton belül külön ágon helyezkednek el a nyugat európai és a kelet-európai törzsek. Utóbbi ágba kapcsolódtak be a Magyarországon kimutatott vírusok is. Az új törzsek egy horvátországi vírussal mutattak genetikai hasonlóságot. A filogenetikai analízisek eredményeiből egyértelműen megállapítható, hogy Közép-Európában – így hazánkban és Horvátország határmenti, északi részén is – legalább két, részben különböző genetikai állományú DOBV hantavírus cirkulál, ezek a Dobrava (AFL) és Kurkino (AAG) típusok. A DOBV fertőzés igazolására a molekuláris vizsgálatok mellett szerológiai vizsgálatokat is végeztünk. A korábban RT-PCR módszerrel vizsgált rágcsálók mindegyikénél a DOBV elleni antitestek jelenlétét ELISA kísérletekben határoztuk meg. ELISA módszerrel összesen 16 *Apodemus* egyedet találtunk pozitívnak, melyek közül hat AFL, tíz pedig AAG rágcsáló volt. A két módszer (RT-PCR és IgG kimutatás) együttes alkalmazásával tehát megállapítható volt a DOBV tényleges gyakorisága a vizsgált régióban, amit 17%-ban állapítottunk meg. Általános gyakorlat, hogy a kórokozók gyakoriságának megállapítására először a rágcsálók mintáit szerológiai tesztelésnek vetik alá, majd az igazolt pozitív mintákkal végeznek további PCR vizsgálatokat a fertőzés tényének megerősítésére. Eredményeink egyértelműen rámutattak arra, hogy ezzel a stratégiával a fertőzés korai stádiumában lévő rágcsálók pozitivitása nem kimutatható, ami téves következtetésekhez vezethet, hiszen így jelentősen alacsonyabb vírus gyakoriságot állapíthatnak meg.

➤ *Egyéb hantavírusok kimutatása és vizsgálata (röviden)*

PUUV kimutatásához *Myodes glareolus* (MGL) rágcsálókat vizsgáltunk. A tesztelt állatok körében 26%-ban mutattuk ki a PUUV jelenlétét tüdőszövetben. A vírus kimutatását RT-PCR vizsgálattal végeztük, általunk tervezett, glikoprotein génre specifikus primerekkel. Az óvilági hantavírusok közül a PUUV nukleinsavat ki tudták mutatni humán megbetegedések kapcsán nyálból is. Ez az eredmény feltételezi a vírus emberről emberre történő terjedésének lehetőségét is, amit ezidáig nem tudtak egyértelműen igazolni. A PUUV-al folytatott kísérleteink során egy esetben sikerült a virális nukleinsavat beteg nyálából nekünk is kimutatnunk. A szakirodalomban ezidáig összesen két olyan publikáció olvasható, ami a PUUV nyálból történő kimutatását ismertette. Kutatásaink során első ízben Tula vírust (TULV) is kimutattunk a vizsgált rágcsáló mintákban (*Microtus arvalis*, MAR) magas, 37%-os gyakoriságban. A filogenetikai elemzés a Nyugat-Szlovákiából és Csehországból származó mintákkal csoportosította a hazai törzseket. Gyakorisága ellenére a TULV emberi fertőzésekben játszott szerepéről keveset tudunk.

➤ *A hantavírus fertőzés klinikuma – esettanulmányok*

Esettanulmány 1.: 2006. augusztus 11-én egy 46 éves hobbi vadász került felvételre a PTE, Klinikai Központ, II-es számú Belgyógyászati Klinika és Nephrológiai Centrumba akut veseelégtelenség diagnózisával. A páciens első klinikai tünetei augusztus 5-én jelentkeztek, láz, diffúz izom- és ízületi fájdalom, gastroenteritisz és homályos látás formájában. A kórházi felvételnélkor (augusztus 11.) a beteg levertségre, hasi és ágyéki fájdalmakra panaszkodott. Az ezt követő fizikai és ultrahangos vizsgálatok periorbitális és láb ödémát, kétoldali mellüri folyadékgyülemet, kis mennyiségű hasüri folyadékgyülemet, valamint megnagyobbodott veséket mutattak. A páciens súlyos akut oliguriás veseelégtelensége következtében hatszori hemodialízis kezelésen esett át, melynek következtében a vizelet mennyisége folyamatosan emelkedett 80 ml/nap értékről 2300 ml/nap értékre. A beteg augusztus 20-ától poliuriássá vált, napi 3000-5000 ml vizeletürítéssel. 17 napi kórházi kezelés után javuló labor- és májfunkciós értékekkel bocsátották haza (augusztus 28-án). A szérum kreatinin értéke december elsején érte el a normál szintet (97  $\mu\text{mol/l}$ ). A klinikai tünetek alapján hantavírus fertőzés vagy leptospirozis gyanúja merült fel. A latex agglutinációs teszt negatív volt *Leptospira* baktériumra, míg az elvégzett szerológiai eredmények (IgG és IgM) igazolták az akut DOBV fertőzést. Virális nukleinsav a klinikai tünetek első megjelenése után négy nappal, az augusztus 9-én vett vérmintában volt kimutatható, a beteg későbbi mintái negatívak lettek. A filogenetikai és nukleinsav szekvencia analízis alapján a páciensből kimutatott DOBV nukleinsav egy, a magyar-szlovén határon (Prekmurje) gyűjtött AFL rágcsló által hordozott vírussal egyezett nagymértékben. A páciens fentiekben leírt összes klinikai tünete és laboratóriumi lelete is a DOBV okozta HFRS szindróma gyanújára utalt, ami igazolódott is. A hazai szakirodalomban ez volt az első, molekuláris biológiai módszerrel is igazolt DOBV fertőzés.

Esettanulmány 2.: A Baranya Megyei Kórház sürgősségi betegellátó osztályán jelentkezett egy 27 éves férfi hasi fájdalommal, mely a jobb alsó kvadránsra lokalizálódott. A kísérő tünetek az alábbiak voltak: hányinger, hányás, étvágytalanság és véres hasmenés. A kezdeti tünetek (láz, valamint erős, diffúz hasi fájdalom) hat nappal korábban jelentkeztek. A tünetek és a fizikai vizsgálatok alapján akut vakbélgyulladás gyanúja merült fel. A Pécsi Diagnosztikai Központban „Computer Tomográf” (CT) felvétel készült. A képalkotó eljárás akut perforált appendicitis diagnózisát állapította meg, így a beteget még aznap (6. nap) a PTE, KK, Sebészeti Klinikájára továbbították. Felvételnélkor vérnyomása és szívfrekvenciája a normális tartományban volt, láza nem jelentkezett. Ugyanakkor rossz általános állapotban erős hasi fájdalomról panaszkodott, dezorientáltság és erős verejtékezés mellett. A has betapintásra

diffúzan lágy volt, maximális fájdalommal a McBurney ponton. A CT és laboratóriumi eredmények alapján feltárási laparoszkópos műtétre került sor, mely a korábban felállított diagnózist nem erősítette meg, a vakbél normális állapotú volt. A műtét utáni napon (7. nap) a betegnél oliguria alakult ki, emiatt átszállították a PTE, KK, II. sz. Belgyógyászati Klinika Nephrológiai Centrumába. Az akut vesekárosodás beállta miatt hemodialízis kezelést indítottak. A páciens a kezdeti tünetek utáni 12. napon poliuriássá vált, trombocita- és fehérvérsejt száma normalizálódott. Tizennégy napi kórházi ápolás (20. nap) után a beteget otthonába bocsátották, normál laborértékekkel és jó fizikai állapotban. Az újabb klinikai tünetek és laboratóriumi paraméterek alapján Leptospira, illetve hantavírus fertőzés gyanúja merült fel. A Leptospira fertőzés a latex agglutinációs teszt eredmények után kizárásra került, az ELISA teszt (Hantavirus IgG/IgM DxSelect, Focus Diagnostics) azonban a beteg szérumában hantavírus pozitív IgM és IgG antitesteket (>1:100) igazolt. Mivel a szerológia nem nyújtott információt a fertőző hantavírus típusról, a vérmintákat nested RT-PCR módszerrel vizsgáltuk. Pozitív PCR reakció után a kórokozó típusát a tisztított PCR amplikon szekvenálásával határoztuk meg. A PCR teszt kimutatta a vérben lévő virális nukleinsavat a kezdeti tünetek utáni 8. napon gyűjtött vérmintában. Az RT-PCR termék molekuláris szekvencia elemzése a DOBV vírushoz genetikailag közel álló kórokozó ágenszt igazolt. Ismert tény, hogy a hantavírus fertőzés az úgynevezett „akut has” kórképhez, különösen a paralitikus ileuszhoz hasonló tünetekkel járhat. Hasonló eseményt már publikáltak PUUV és KKVLV fertőzés kapcsán is.

➤ *4.1.4.3 A hantavírus fertőzés klinikuma –akut vesebetegséggel hospitalizált betegek vizsgálata*

2011 januárjától – 2015 decemberéig 94 embert vizsgálatunk, akiknél a feltételezett diagnózis hantavírus fertőzés volt. Mindegyik beteg esetén közös tünetek az alábbiak voltak: láz, magas leukocita szám, trombocitopénia, magas szérum kreatinin és/vagy transzamináz szint, valamint fennálló vizeleti rendellenességek. Minden beteg mintája negatív leptospirozis tesztet adott. Szerológiai vizsgálatok alapján, összesen kilenc beteg esetében sikerült igazolni a hantavírus fertőzést. Hét beteg mintájából lehetett egyidejűleg kimutatni IgM és IgG antitesteket is, ami akut fertőzésre utalt, míg két beteg esetében csak anti-hantavírus IgG-t detektáltunk. Az utóbbi két betegnél egy lezajlott fertőzést igazoltunk, az akut fertőzés tényét nem tudtuk bizonyítani. A szerológiai vizsgálatokkal egyidejűleg a szérum mintákat egy lépéses TaqMan RT-PCR alkalmazásával is megvizsgáltuk; egy akut HRFS esetről volt detektálható hantavírus RNS is. Az utóbbi esetről a szekvencia analízise alapján egyértelműen DOBV fertőzést mutattunk ki. A klinikai tünetek közül, az emésztő-szervrendszeriek

domináltak, míg hemorrhágiás tünetek (ami fontos jele a súlyos megbetegedésnek) csak egy beteg esetében voltak, akinél a gyomortükrözés során hemorrhágiás gasztritist állapítottak meg. Magas láz gyakori, habár nem feltétlenül jelenik meg egyenlő arányban a hantavírus fertőzötteknél. Fejfájás, végtag duzzadás, homályos látás és szédülés megfigyelhető volt. A laborértékek közül a thrombocitopénia a legárulkódóbb jel, mely emelkedett szérumszinttel társul. A leukocita szám emelkedés nagyon különböző mértékű volt a betegeknek, míg a szérumszint emelkedés nem volt nagymértékű vagy egyáltalán nem is volt tapasztalható. Általában a hospitalizációt igénylő esetekben a vesefunkció rendellenességek (oliguria/anuria) majdnem mindig szembetűnők, ami összhangban van a magas szérumszinttel. Vizsgálatainkba bevont betegek mindegyikénél jelentősen csökkent a vizeletürítés szintje, ami vérvizeléssel és/vagy fehérjeürítéssel társult. Ennek ellenére egyik betegnek sem volt szüksége hemodialízisre. Egy beteg esetében lehetőség nyílt a szérumszint nyomon követésére, amely során a fertőzés után hét hónappal vett minta is IgM-pozitívítást mutatott. A Balkán régióban szintén a DOBV és PUUV hantavírus törzsek állnak a klinikai esetek hátterében. A HFRS vagy sporadikusan, vagy nagyobb kitörések formájában jelenik meg, a vírust hordozó rágcsálók lokális abundanciájának függvényében. A klinikai tünetek sokfélesége miatt a hantavírusok korai differenciál diagnózisa igen nehéz. Így például az egyéb felmerülő diagnózis lehet: egyéb okra visszavezethető akut vesekárosodás, illetve tubulointersticiális nefritisz, akut lázas húgyúti fertőzés, akut és krónikus glomerulonefritisz, akut has, vakbélgyulladás, vérzéssel járó skarlát, hemolitikus urémiás szindróma, trombotikus thrombocitopéniás purpura, akut légúti megbetegedések, illetve szepsis.

➤ *Szeroprevalencia vadászok és erdészeti dolgozók körében*

Összesen 835 vérmintát gyűjtöttünk önkéntes, egészséges erdészekről, 9 megye 106 erdészetéből. Az ELISA és WB vizsgálatok után 38 (4,6%) minta bizonyult anti-hantavírus IgG pozitívnak. Az országot 4 fő régióra osztottuk: észak-dunántúli régió (I), kelet-dunántúli régió (II), Duna-Tisza köze (III) és Északi-Középhegység (IV). A gyűjtött és tesztelt minták a következőképpen oszlottak meg a különböző régiók között: 248 minta az I. régió 6 mintázó helyéről; 321 minta a II. régió 16 mintázó helyéről; 107 minta a III. régió 5 mintázó helyéről és 159 minta a IV. régió 5 mintázó helyéről érkezett be. Habár a teljes szeroprevalencia 4,6% volt, a régiókat összehasonlítva a IV. régióban volt a legmagasabb, itt 8,2%-os értéket mutatott. Mivel a humán hantavírus fertőzések forrását a hordozó rágcsálók jelentik, a fenti módon nyert, területre jellemző szeroprevalencia eltérések tükrözhetik az adott helyek közti rágcsáló expozíciót. A legmagasabb hantavírus szeroprevalencia értékeket az I. és IV. jelzésű, kiterjedt hegyvidéki erdőségeink területén mértük, ahol az AAG és AFL rágcsálók aránya magas. A III-

as területen mért igen alacsony szeroprevalencia feltehetően a kicsi és nyitott erdőfoltos jellegnek köszönhető, ahol a kisemlős populáció jóval kevertebb, számos egyéb rágcsáló és cickány fajjal kibővülve. A Magyarországon végzett átfogó vizsgálatunk alapján feltételezzük, hogy a hantavírus szeroprevalencia az erdészeti dolgozók körében hasonlít a közép-európai-balkáni tengely értékeihez, ezért a hantavírus fertőzés nagyobb figyelmet érdemel a kockázati populációban a jövőben.

### **Ízeltlábúak terjesztette vírusok vizsgálata**

#### **➤ *Krími-kongói vérzések láz vírusa (KKVLV)***

Kutatásunk egyik kiemelt jelentőségű témája a KKVLV előfordulásának igazolása volt. Kutatásaink első lépéseként a vírus vizsgálatára alkalmas módszertant kellett kidolgozni, aminek megfelelően két különböző szerológiai vizsgálati tesztet fejlesztettünk és optimalizáltunk. Ezek egyike ELISA, míg a másik IFA vizsgálat volt, mindkettő esetében antigénként KKVLV rNP alkalmazásával (rNP ELISA és CHO-KKVLV transzgenikus sejtvonal). A szakirodalomból ismert, hogy a vírus gyakran fertőz mezei nyulakat, vizsgálatainkat így ezen állatok vérmintáinak szerológiai tesztelésével kezdtük. A vizsgált minták 6%-a adott pozitív eredményt mind az ELISA, mind pedig az IFA vizsgálatnál. Eredményeink szépen kiegészítik azt a történelmi megfigyelést, hogy a KKVLV endemikus gócai jelen vannak Magyarországon, azonban a rezervoár fajok, vektorok és amplifikáló gazdák teljes spektrumának felderítéséhez még további vizsgálatok szükségesek. KKVLV fertőzésekre vonatkozó szerológiai bizonyítékok kézzelfoghatók, azonban sok felderítendő terület maradt ahhoz, hogy megismerjük és megállapítsuk közegészségügyi vonatkozásait. A legfontosabb a vírus tényleges molekuláris biológiai igazolása lenne. Kutatócsoportunk a szeropozitív nyulak területéről gyűjtött kullancsokban próbálta a vírus jelenlétét kimutatni saját fejlesztésű, univerzális, minden ismert KKVLV törzs kimutatására alkalmas TaqMan RT-PCR módszerrel, azonban ezidáig minden teszt negatív eredményt adott. A KKVLV jelenlétének molekuláris igazolása ezidáig nem volt sikeres.

#### **➤ *Kullancsenkefalitisz vírus (KEV)***

A kullancsenkefalitisz vírussal (KEV) végzett vizsgálatainkban mind a hordozó rágcsáló fajok, mind pedig a kullancs vektor vizsgálatára fókuszáltunk. Igazolni szerettük volna a kisemlősök szerepét a vírus terjesztésében, vizsgáltuk a kullancsok átfertőzöttségét, valamint a vírus genetikai állományát. Az általunk gyűjtött kullancsfajok közül csak az *Ixodes ricinus*-ból tudtuk igazolni a vírus jelenlétét. Az elvégzett filogenetikai elemzés is azt mutatta, hogy az általunk azonosított KEV törzsek az európai altípushoz tartozó KEV törzsekkel csoportosulnak.

A kisemlősök körében végzett kutatásunk során összesen 17 mintában sikerült kimutatni a vírus RNS jelenlétét. A filogenetikai elemzés során a KEV törzsek szintén a vírus európai altípusához tartozó törzsekhez csoportosultak. Az elmúlt évtizedek során Európában nőtt a diagnosztizált KEV fertőzések száma, beleértve olyan országokat is, ahol ezidáig nem volt jellemző a KEV vírushoz köthető megbetegedés. A KEV endemikus területeken az *I. ricinus* és *I. persulcatus* kullancsfajok számítanak elsődleges vektornak, habár számos tanulmány eredményei szerint a potenciális vektorfajok száma bővebb. A rendelkezésünkre álló irodalmi adatokkal összhangban az általunk gyűjtött kullancsfajok közül csak az *I. ricinus* fajt tartalmazó minták mutattak KEV pozitivitást. A rágcsálókkal végzett vizsgálatunk során az AAG, AFL, MAR és MGL fajokat azonosítottuk, mint gazdaszervezetek. A kisemlősök tulajdonságai számos szempontból hozzájárulnak és segítik a KEV terjedését. Először is az endemikus területeken magas egyedszámmal fordulnak elő, ahol kullancsok által erősen parazitáltak, másodszer a kisemlősök biztosítják a vírus nem virémiás átvitelét a fertőzött és nem fertőzött kullancsok között táplálkozás közben. Eredményeinkhez hasonlóan, egy korábbi magyarországi tanulmány során is az AFL és MGL fajokat azonosították, mint elsődleges KEV gazdaszervezet az országban, habár jelen tanulmány igazolta a vírus jelenlétét AAG és MAR fajokban is. Eredményeinket figyelembe véve, valamint más kutatók eredményeivel egyetértésben kijelenthetjük, hogy a kisemlősök fontos szerepet töltenek be a KEV életciklusában, ezért az említett állatok rendszeres monitorozása jó prognosztikai adatokat szolgáltat a KEV aktivitásról az ország endemikus régióin belül.

➤ *Nyugat-nílusi vírus (WNV)*

Kutatásaink fontos témája a Nyugat-nílusi vírus (WNV) vizsgálata volt. A kórokozó egyre nagyobb mértékű elterjedése jó példa a szúnyogok által terjesztett vírusos megbetegedések térhódítására napjainkban. A vírus régiós szintű vizsgálata nem csak virológiai szempontból érdekes, de hasznos információkat szolgáltat mind a humán-, mind pedig az állategészségügy és közegészségügy számára is. Szerb kollégákkal végzett tanulmányunk során összesen 6369 nőstény szúnyogot vizsgáltunk, melyeket 180 csoportba soroltunk (maximum 50 egyed/csoport). 10 (5,5%) bizonyult WNV pozitívnak, melyek közül 9 származott *Culex pipiens* és egy pedig *Anopheles maculipennis* fajból. A kimutatott vírusokat sikeresen izoláltuk C6/36 sejtvonalon, majd többször passzáltuk Vero-E6 sejteken is. A vírus figyelemre méltó aktivitását jól példázza a 2013 során igazolt számos humán eset, valamint a szúnyogok magas fertőzöttségi aránya ugyanazon vizsgálati évben. A filogenetikai elemzés jól mutatja, hogy a szerbiai WNV törzsek egyértelműen a 2-es genetikai variánshoz tartoznak, valamint jelentős eltérést mutatnak az országon belüli földrajzi területek szerint is. A 2013-as szerbiai WNV



törzsek egyértelműen közelebbi rokonságot mutatnak a 2012-es olaszországi és a 2010-es görögországi WNV törzsekkel. Más kutatócsoportok által végzett előzetes vizsgálatok szerint a WNV 2-es genetikai variánsának legalább két különböző genetikai csoportja cirkulált egyidejűleg 2012-ben Szerbiában, felvetve annak a lehetőségét, hogy a vírust két eltérő esemény során hurcolták be az országba. Vizsgálataink során feldolgozott szúnyogokból származó WNV törzsekkel végzett filogenetikai vizsgálatok is egy független bejutási, terjedési eseményt igazolnak. Feltételezhetően a vírus Olaszországból, Görögországból, vagy Afrikából érkezhetett (esetleg vándorló madarakon keresztül), ahol a WNV 2-es genetikai variánsa hosszú ideje enzootikus. A vírussal végzett további vizsgálatainkban az általunk kimutatott törzsek teljes genom alapú, komplex molekuláris biológiai és filogenetikai analízisét végeztük el. Vizsgálatunk során összesen hat aminosav változást találtunk különböző pozíciókban a polipeptid kódoló régiókn belül, amelyek között a WNV megváltozott patogenitására és virulenciájára vonatkozó számos, korábban már leírt, aminosav-szubsztitúciót is azonosítottunk. Még érdekesebb, hogy az NS3 régió 249-es pozíciójában (NS3<sub>249</sub>P) a Pro aminosav-szubsztitúció is mind a hat törzs esetében kimutatható volt. Ezt a mutációt korábban a megnövekedett neuropatogenitás potenciális markereként írták le. Továbbá párhuzamos mutációt mutattunk ki az NS3 fehérje helikáz doménje és az NS4B TM fehérjeje között, amely mutáció befolyásolhatja a fehérje-fehérje kölcsönhatást, és ezáltal az NS3 fehérje RNS-kötődését, elősegítve a virális replikációt. Az előbb leírt eredményeink egyfelől magyarázattal szolgálnak a 2013-ban előfordult nagyszámú humán esetre Szerbiában, a vírus robbanásszerű terjedésére az érintett területeken, valamint a 2014-ben Szerbiában kitört WNV járványra egyaránt. Szúnyog vizsgálatainkkal már prognosztizáltuk a fertőzések számának növekedését, és egy esetleges járvány megjelenését. Eredményeink nagyban támogatják a jövőbeli molekuláris vizsgálatokat, valamint felhívják a figyelmet a neuropatogén hatással járó mutációk vizsgálatának fontosságára.

A vírussal végzett vizsgálatainkban egy hasonló, Baranya-megyében elvégzett szúnyog monitoring keretén belül összesen 23029 db nőstény szúnyogot szűrtünk, és kerestük a WNV 1-es, valamint 2-es genetikai variánsát a régióban. Habár ezeket a genetikai variánsokat nem sikerült megtalálnunk, egy sokkal nagyobb jelentőségű eredményt tudtunk felmutatni, nevezetesen egy új genetikai variáns megjelenését egy szintén új szúnyogfajban. Ez a genetikai variáns a 9-es variáns nevet kapta. A vírust *Uranotaenia unguiculata* nőstény egyedekből sikerült azonosítani. Mindeztidáig csak WNV-szerű vírust (ún. "Volgograd vírus") azonosítottak az *U. unguiculata* szúnyogfajban, Oroszországban. A filogenetikai fán a magyarországi WNV-9 szekvencia más WNV törzsekkel csoportosult, de egyértelműen külön monofiletikus ágat

alakított ki. Az új magyarországi WNV törzs a legnagyobb hasonlóságot a WNV-4 képviselőivel, valamint a feltételezett 8-as genetikai variánssal mutatta, amelyek Oroszországból és Spanyolországból származtak.

➤ *Usutu vírus (USUV)*

Az előzőekben már ismertetett vizsgálatok megkezdése után, a Szerb kollégákkal folyamatos kapcsolatban dolgoztunk, aminek egy hosszú távú, szisztematikus vizsgálat lett az eredménye. A továbbiakban összesen 23753 szúnyogot gyűjtöttünk és vizsgáltunk meg. A szúnyogokat csoportokba gyűjtöttük (faj, gyűjtési hely és idő szerint, maximum 50 egyed/csoport). Összesen 753 szúnyog csoportot vizsgáltunk, amiből USUV jelenlétét 3-ból (0,4%) sikerült kimutatni. A pozitív minták augusztusban gyűjtött *C. pipiens* fajból származtak. A vírus teljes kódoló régióját sikerült meghatároznunk egy részleges 3'-UTR-fragmenssel együtt. Az ismert, feltételezett genetikai törzsek reprezentatív tagjait (Afrika 2 és 3, Európa 1-4) kiválasztottuk, hogy az általunk leírt törzs esetleges evolúciós kapcsolatait felderítsük. A kapott filogenetikai eredmények, valamint a részletes molekuláris vizsgálatok alapján a szerbiai USUV törzs egyértelműen az európai 1-es genetikai variánsok közé sorolódott, amelyet eredetileg Ausztriában 2001-ben írtak le. Az 1-es genetikai variáns jelenléte Szerbiában a vírus földrajzi terjeszkedését jelzi a balkáni félsziget délkeleti területein. Az általunk elvégzett tanulmány nyújtotta az első bizonyítékot az USUV európai 1-es genetikai variáns földrajzi kiterjedésére a balkáni félsziget déli területein, és szolgáltatja az USUV első genetikai adatait a térségben.

## **Denevérek hordozta vírusok jellemzése**

➤ *Astrovírusok (BtAstV)*

Az első nagyléptékű, európai, denevér eredetű astrovírus (BtAstV) felmérést Magyarországon több, különböző denevér faj bevonásával végeztük el. Összesen a minták 6,93%-ban mutattuk ki a vírust, amely a *M. schreibersii* fajban magasabb előfordulást mutatott. Kutatásunk során azonban további 7 hordozó denevér fajt azonosítottunk. A nagy kolónia, illetve a kimagasló repülési képesség is hozzájárulhatott ahhoz, hogy a *M. schreibersii* denevérek körében gyakrabban detektáltunk BtAstV-t. A hipotézist, miszerint a nagy kolónia méret hozzájárul a különböző vírusok terjedéséhez, korábbi tanulmányok is alátámasztják. A szekvencia és filogenetikai analízis egyértelműen azt mutatta, hogy a magyar BtAstV törzs azonos klaszterbe tartozik a többi világszerte azonosított BtAstV törzsekkel, és jelentősen eltér a többi emlős eredetű AstV törzstől. Az eddigi tanulmányoknak megfelelően, a hazai vizsgálatokban is magas genetikai variabilitást figyeltünk meg a BtAstV törzsek között, amely

összefüggésbe hozható a hordozó fajjal is; az adott fajra jellemző szegregációs mintázatokat mutatja. A nukleinsav szekvencia azonosság mértéke 51% és 75% között változott a Magyarországon detektált BtAstV és a világon, más helyeken leírt BtAstV törzsek között. Az ICTV irányelvei szerint az átlagos nukleinsav szekvencia divergenciája AstV törzsek között minimum 55%. Ennek megfelelően az alacsony szekvencia divergenciájából is kiindulva feltételezhetjük, hogy a Magyarországon leírt BtAstV törzsek akár új fajok az AstV-k között.

➤ *Calicivírusok (BtCalV)*

Hasonlóan a hazánkban kimutatott BtAstV-hoz, új denevér calicivírus fajokat (BtCalV) írtunk le három denevérfajban: *M. daubentonii*, *M. alcathoe* és *E. serotinus* egyedekből. A kimutatási ráta a mintázott denevérek között 0,67% volt. A filogenetikai törzsfá is jól mutatta, hogy a hazai BtCalV törzs, mely *M. daubentonii*-től származott, sokkal közelebb áll a sertés sapovírusokhoz, de különbözik a Kínában izolált denevér sapovírusoktól. A BtCalV törzs, ami *E. serotinus*-tól származott, kívül eső törzsnek tűnik a *Recovírus* és *Valovírus* nemzetségek között. Még ennél is érdekesebb a *M. alcathoe*-től származó BtCalV, ami madár CalV-al szegregálódott és nem más emlős vírusokkal. Annak érdekében, hogy molekuláris szinten még részletesebben jellemezzük a hazai BtCalV-kat, meghatároztuk a törzsek genom szekvenciájának nagy részét a 3' RACE PCR módszer alkalmazásával. A szekvenált genomi régió magába foglalta az RNS-függő RNS polimeráz gén egy részét, a teljes burok fehérje kódoló régióját, továbbá a VP2 fehérje teljes kódoló szakaszát. A calicivírusok konzervált aminosav motívumait, a GLPSG-t, YGDD-t és DYXXWDST még így is sikerült azonosítanunk. Ez utóbbinál a hazai mintákban leírt aminosav sorrend a DFSKWDST volt. A *Myotis* és *Eptesicus* denevérekben leírt a rokon calicivírusok szintén azt bizonyítják, hogy egymástól jelentős földrajzi távolságban élő fajok is hordozhatnak genetikailag közelálló vírusokat. Ez az eredmény egy ősi evolúciós kapcsolat meglétét veti fel a denevérek és vírusaik között és feltételezhetően a denevérek laurasiatheriai eredetének a következménye. Részletes szerkezeti vizsgálatokat is végeztünk a calicivírusok kapszidjával. Homológia modellezés által pontosabb jellemzést tudtunk adni a két fent említett, új calicivírus felszíni struktúráiról, modellezni tudtuk a két vírus kapszidját és virionját. Az érett calicivírus kapszid fehérjénél három fő domént írtunk le: S, P1 és P2. Az S domén nyolc-szálú  $\beta$ -hordó szerkezettel rendelkezik. Ez a domén alkotja a virion belső részét, és a calicivírusok között ennek a fehérjének van a legkonzerváltabb szerkezete. A P1 és P2 domén építi fel a középső és külső régióját a virionnak. A hipervariábilis szerkezeti struktúrák (melyek a neutralizáló antitestek elsődleges célpontjai), a P2 doménben találhatóak. Az alapszerkezet az ismert fő doménnel együtt konzerváltnak tűnt a két magyar törzs esetében is, habár számos delécio és egy inszercio

is található a hazai BtCalV törzsekben. Ezekből a kis szerkezeti és szekvenciabeli különbségekből adódó fehérjeszerkezeti eltérések feltételezhetően fontos szerepet játszanak a P2 domén kettős szerepének betöltésében. Egyfelől a vírus felszíni régiói valószínűleg antigénként szolgálnak a humorális immunrendszer számára, másfelől részt vehetnek a fehérje-fehérje kapcsolat létrehozásában a kapszid és a megfelelő receptor között ezzel elősegítve a fertőzést. A genomszekvenálás, a filogenetikai vizsgálat és a homológia modellezés sokkal pontosabb jellemzését tették lehetővé az általunk leírt új BtCalV-nak. Bár az eddig leírt BtCalV törzsek jelentős genetikai variabilitást mutatnak, az egyértelműen látszik, hogy a faj specificitás kimutatható a különböző gazdákból izolált vírusok között, amely egy hosszú távú evolúciós folyamatra vezethető vissza.

#### ➤ *Koronavírusok (BtCoV)*

Az általunk elvégzett szisztematikus tanulmány során, hazánkban először sikerült denevérek hordozta koronavírusokat (BtCoV) kimutatnunk összesen 1,79%-ban. A tanulmány egyik legérdekesebb eredménye, hogy az alfa ( $\alpha$ )-BtCoV mellett SARS-szerű BtCoV-t mutattunk ki a hazai denevérekből. Az elvégzett filogenetikai analízis alapján az új, magyarországi BtCoV törzs azonos klaszterbe tartozott a korábban Németországban és Bulgáriában leírt BtCoV törzsekkel. A hazánkban kimutatott  $\alpha$ -BtCoV törzsek 52-96% nukleotid azonosságot mutattak egyéb  $\alpha$ -BtCoV-kal, míg a magyarországi béta ( $\beta$ )-BtCoV törzs 82-96% nukleotid azonosságot mutatott egyéb  $\beta$ -BtCoV törzsekkel. Számos denevérfaj világszerte természetes rezervoár szervezete különböző CoV törzseknek, többek között a SARS-hoz és MERS-hez köthető koronavírusoknak is. A növekvő urbanizáció hatására gyakrabban alakulnak ki interakciók denevérek és emberek között. Mivel a denevérek által terjesztett divergens CoV törzsek lehetnek patogének emberre, illetve háziállatokra egyaránt (pl.: SARS, MERS koronavírusok), szisztematikus monitoring vizsgálatok és további általánosan alkalmazható diagnosztikai eljárások kidolgozása szükséges, hogy a zoonotikus potenciállal bíró vírusokat detektálni tudjuk még egy esetleges járvány kitörése előtt.

#### ➤ *Pikornavírusok (BtPV)*

Vizsgálataink során, hat mintából sikerült kimutatnunk denevér pikornavírust (BtPV). A virális metagenomika által nyert szekvencia adatok alapján elvégeztük az 5' és 3' RACE PCR kísérleteket a genomi végek szekvencia adatainak megismerésére. Kísérleteink eredményeként a virális genomot majdnem teljes hosszában meghatároztuk. A megismert szekvencia adatok a teljes kódoló régiót magukba foglalták, a teljes 3' UTR, és az 5' UTR egy részével együtt. A vírus a rokon pikornavírusokhoz hasonló genomorganizációs elrendezést mutatott; 5' UTR[L-P1(VP0, VP3, VP1)-P2(2A, 2B, 2C<sup>hel</sup>)-P3(3A, 3B<sup>VPg</sup>, 3C<sup>pro</sup>, 3D<sup>pol</sup>)]3' UTR-poly(A).

Megállapítást nyert, hogy az L fehérjéről hiányzik a „papain-szerű thiol-proteáz katalitikus diáda” (Cys és His), illetve a CHCC cink-kötő motívum is. A VP0/VP3 és VP3/VP1 hasítási helyektől eltekintve ugyanazt a hasítási mintázatot figyeltük meg, mint a legközelebbi rokon Mischivírus referencia vírustörzsnél. A fehérje motívum adatbázis (CDD) használatával számos pikornavírus-specifikus motívumot azonosítottunk, ezek: Rhv-szerű kapszid domén (cd00205), 2C RNA helikáz (pfam00910), 3C cysteine proteáz (pfam00548) és 3D RdRp (cd01699). A genom 5' UTR tekintve, a szekvencia hasonlóság és a másodlagos szerkezeti analízisek alapján II-es típusú IRES-t (belső riboszóma belépési hely) kódol a genom. Szemben a hazánkban leírt vírussal, az eddig leírt BtPV-ok a IV-es típusú IREST kódolják. A II-es típusú IRES-ekre jellemző, fő konzervált részek közül a H, I, J, K és L régiókat azonosítottuk az 5' UTR-ban. Számos egyéb, II-es típusú IRES-re jellemző elemet is feltártunk, például a GNRA tetranukleotid és a két A/C gazdag hurok régiót az I domén apikális végén, továbbá „adenin” gazdag régiókat a J és K domének tövéénél. Az L huroktól 3' irányba egy 8 nukleotid hosszú oligopirimidin szakasz található. A 3' UTR elemzése során 76%-os nukleotid szintű azonosságot tártunk fel a Mischivírus A-val. A teljes 3' UTR hossza 211 nukleotid (a STOP kodonnal együtt). A 3' UTR másodlagos struktúrájának predikciója hat domén jelenlétét tárta fel (A-F). A C domén egy AAGCCA<sub>88-93</sub> motívumot, míg a D egység az UCUUCU motívum egyik variánsát (CCUUCU<sub>115-120</sub>) tartalmazza. A pikornavírusok 3' UTR változatos méretű és számú másodlagos hurok struktúrát tartalmaz, amelyet a virális és celluláris fehérjék kötőhelyeként feltételeznek. A teljes kódoló régióra elvégzett filogenetikai rekonstrukció az általunk leírt vírustörzsek közeli rokonságát tárták fel a *Mischivirus* genus már ismert tagjával a Mischivírus A-val, amelyet 2012-ben írtak le Kínában, szintén *Miniopterus denevérfajból*. A teljes P1 régió, P2 régió és P3 régió 73%, 73-74% és 67% aminosav szintű azonosságot mutat a Mischivírus A-val. Ugyanezen régiókkal összehasonlítva a hazai BtPV 32-37%, 35-39% és 29-32% aminosav szintű azonosságot mutat más denevérekből származó pikornavírusokkal a *Sapelovirus* genusból. A Mischivírus A esetén leírt fő aminosav motívumok az általunk vizsgált vírustörzsek esetében is kimutathatóak voltak. A referencia Mischivírus A törzsszel összevetve az általunk vizsgált vírusok minimális különbséget mutattak: L fehérjéje 6 aminosavval rövidebb, a P2 régió 1 aminosavval hosszabb és a P3 régió 3 aminosavval rövidebb. Filogenetikai rekonstrukciónk és genomikai sajátosságai alapján az általunk közölt vírustörzsek a *Mischivirus* genus egy új tagját jelentik.

➤ *Parvovírusok – denevér bufavírus (BtBV)*

Parvovírussal rokon szekvencia adatokat szintén a hazánkban gyűjtött *M. schreibersii* mintáink metagenomikai elemzése során sikerült nyernünk. 13 mintából 5 minta pozitívnak

bizonyult, 2 minta esetében a nagyobb szegmens megsokszorozása is sikerrel járt. Ezen régió szekvenálása révén 3438 nukleotid hosszú genomi részt tudtunk analizálni, ami magába foglalta a 975 nukleotid hosszú NS1 szakaszt és a 2013 nukleotid hosszú VP1/VP2 géneket. Az NS1 és VP1/VP2 rész mellett egy másik kódoló szakaszt is azonosítottunk a kinyert szekvenciában, ami egy 450 nukleotid hosszú, úgynevezett feltételezett középső fehérje (PMP). Azonosítottuk a foszfolipáz A2 motívumot is a VP1 szakaszban, ami a parvovírusokra nagyon jellemző, míg más víruscsaládokba tartozó vírusoknál nem található meg. Az NS1 szakaszon található Walker loop mintázata (GXXXXGK T/S) az általunk vizsgált szekvenciánál az alábbi aminosavsorrenddel jelent meg: GPASTGKS, ugyanezt már leírták az embert fertőző bufavírusoknál is. A nukleotid szekvenciák, a referenciaként használt kínai denevér parvovírus szekvenciával 77% és 81% azonosságot mutattak. Másrésről, a *Parvovirinae* családba tartozó más vírusokhoz képest a nukleotid szekvenciájuk 45-47%-ban, míg aminosav szekvenciájuk 35-42%-ban mutatkozott azonosnak. Filogenetikai vizsgálatok alapján, az új BtBV közeli rokonságot mutattak az embert fertőző bufavírusokkal, melyek a *Protoparvovirus* családba tartozó *Primate protoparvovirus 1* törzsek. A filogenetika rávilágított arra, hogy a denevérekhez köthető bufavírusoknak közös, ismeretlen őse lehet az eddig ismert, embert fertőző bufavírusokkal. A hazai BtBV szekvenciákkal végzett rekombináció analízis eredményeként egy potenciális rekombinációs eseményt tártunk fel a WUHARV parvovírus és a denevérekhez köthető bufavírusok között. Denevérekhez köthető parvovírusok esetében hasonló eseményeket írtak le indonéziai megadenevérekből is. A legközelebbi őse a megadenevér bufavírus 1-nek rekombinációs események során jöhetett létre, amely szintén jól mutatják ennek fontosságát a vírusok evolúciójában.

➤ *Filovírusok (LLOV)*

A *M. schreibersii* feltételezhetően Lloviu (LLOV) filovírus fertőzéseként bekövetkező pusztulására hivatkozva Magyarországon is elindítottunk egy felmérést a hazai denevérkutató kollégákkal. Összesen öt beteg állatot sikerült begyűjteni (ennél azonban sokkal több állat pusztult el, de a tetemek állapota nem tette lehetővé a további molekuláris biológiai, virológiai vizsgálatokat) és a pécsi laboratóriumba szállítani. Mivel egy ezidáig ismeretlen patomechanizmusú és zoonótikus tulajdonsággal rendelkező filovírusról volt szó, a kísérleteket BSL-4 biztonsági szintű laboratóriumban végeztük. Filovírus RNS-t sikeresen mutattunk ki egy elhullott egyed esetében. Megvizsgálva a szervek érintettségét, csak a lép és a tüdő esetében kaptunk pozitív reakciót (máj, vese és agy negatívnak bizonyult). A szekvenálást követő BLAST keresés egyértelműen igazolta, hogy a hazánkban kimutatott vírus nukleotid szekvenciája legjobban a spanyolországi törzshöz hasonlít (98%). A további filogenetikai

vizsgálatok is megerősítették az előbbi eredményt, miszerint a hazai filovírus egy újabb LLOV törzs a *Cuevavirus* nemzetségen belül. Mivel a vírust csak két esetben sikerült kimutatni (Spanyolország és Magyarország), izolálási kísérletek ezidáig nem történtek. A vírus izolálásához több, laboratóriumunkban rutinszerűen alkalmazott sejtvonalat (Vero, VeroE6, A549, HEK293) valamint egy, az előzőektől ritkábban alkalmazott denevér sejtvonalat (Tb1-Lu) használtunk. Izolálási kísérleteink mindegyike negatív eredményt adott. Több mint egy évtized után a spanyolországi (Cueva del Lloviu), tömeges hosszúszárnyú denevér (*M. schreibersii*) pusztulást követően, a LLOV újra felbukkant Európában, amikor jelentős elhalálozást okozott Magyarországon ugyanannál a denevérfajnál. Ez az eset felveti a kérdést, hogy vajon ez egy második megfertőződési esemény Európában, vagy a vírus folyamatosan kering az európai denevérek között. Annak érdekében, hogy felfedjük a valódi forrását a LLOV-nak, további felmérések szükségesek, beleértve a denevérekhez kapcsolódó niche-ek vizsgálatát is. Az általunk leírt eset az első filovírus szekvencia, melyet Magyarország területéről jelentettek és ez a LLOV jelentős földrajzi elterjedtségét is sejteti. Figyelembe véve a magyarországi és spanyolországi hosszúszárnyú denevérek pusztulását, a vírus állatvédelmi szempontból is jelentős kockázatot jelenthet. Mivel számos fontos kísérlet hiányában a vírus tényleges zoonótikus potenciálja sem ismert, a jövőben ennek tisztázására további célzott kísérleteket tervezünk.

## ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

### Hantavírusok

#### ❖ *Hantavírusok komplex hazai vizsgálata*

- Az előzetes irodalmi adatok alapján megterveztünk, optimalizáltunk és sikeresen alkalmaztunk egy *E. coli* alapú fehérje expressziós rendszert.
- A rendszer segítségével további immunológiai, szerológiai vizsgálatokra alkalmas, hat hisztidint tartalmazó DOBV és PUUV rekombináns teljes és csonka nukleokapszid fehérjét állítottunk elő. A 6xHis segítségével a fehérjéket  $\text{Ni}^{2+}$ -kelát oszlopon tisztítottuk.
- A tiszta, rekombináns fehérjékkel ELISA és WB vizsgálatokat optimalizáltunk, illetve megállapítottuk az alkalmazott tesztek specificitási és szenzitivitási értékeit.
- Molekuláris biológiai és filogenetikai módszerekkel igazoltuk az AAG és AFL által terjesztett DOBV jelenlétét hazánkban.
- Az elvégzett filogenetikai analízisekkel, valamint a virális nukleinsav összehasonlító vizsgálatokkal alátámasztottuk az előzetes taxonómiai felvetést a DOBV fajon belüli genotípusok megkülönböztetésére.
- Megállapítottuk a hazánkban és a környező országokban kimutatható vírusok szoros filogeográfiai kapcsolatait.
- Alátámasztottuk, hogy hazánkban a DOBV Dobrava és Kurkino genotípusai cirkulálnak egyidejűleg.
- Az együttes molekuláris biológiai és szerológiai vizsgálatokkal megállapítottuk a DOBV tényleges prevalenciáját a vizsgálatba bevont rágsálók körében, amit a hantavírus fertőzés rágsálókban történő dinamikájával magyaráztunk.
- Igazoltuk a PUUV jelenlétét hazánkban a vizsgálatba bevont MGL rágsálók körében.
- Igazoltuk a PUUV RNS jelenlétét akut veseelégtelenségben szenvedő beteg nyálmintájából.
- Első ízben írtuk le a TULV jelenlétét hazánkban MAR és MSU rágsálókban, megállapítottuk annak magas prevalenciáját a vizsgálati régióban, elvégeztük a vírusok filogenetikai vizsgálatát.



❖ *Hantavírusokkal végzett klinikai, szeroepidemiológiai vizsgálatok*

- Első ízben igazoltuk molekuláris módszerekkel a DOBV fertőzést heveny veseelégtelenséggel járó hemorrhágiás lázban szenvedő beteg vérmintájából hazánkban.
- Első ízben készítettük el a DOBV fertőzés pontos klinikai nyomon követését, a betegség lefolyásának jellemzését, és a fertőzést okozó vírustörzs filogenetikai analízisét hazánkban.
- Elsőként igazoltunk molekuláris biológiai és filogenetikai módszerekkel a DOBV fertőzés mimikálta heveny fégnyűlvány-gyulladást akut veseelégtelenségben szenvedő betegben.
- Szoros együttműködésben a klinikusokkal igazoltuk a hantavírus fertőzés tényét hét beteg esetében, majd elvégeztük a kórlefolyás klinikai analízisét.
- Elsőként végeztünk országos felmérést hazánkban a hantavírus fertőzés szeroprevalenciájának megállapítására a rizikócsoportba tartozó vadászok és erdészeti dolgozók körében.

**Ízeltlábúak terjesztette vírusok vizsgálata**

❖ *Krími-kongói vérzések láz vírusa*

- Megteremtettük a további szerológiai vizsgálatok hátterét BSL-2 laboratóriumi körülményekhez.
- *E. coli* fehérje expressziós rendszerrel rekombináns nukleokapszid fehérjét termeltettünk, majd tisztítottuk és ELISA vizsgálatokhoz használtuk.
- Transzgenikus CHO-KKVLV sejtvonalat hoztunk létre, amit IFA vizsgálatban alkalmaztunk.
- Elsőként igazoltuk mezei nyulak szeropozitivitását hazánkban a két immunológiai módszer együttes alkalmazásával.
- Megerősítettük a vírus jelenlétét hazánkban, és felvetettük egy közép-európai KKVLV törzs meglétének lehetőségét *Ixodes ricinus* kullancsokban.

❖ *Kullancsenkefalitisz vírus*

- Molekuláris biológiai módszerrel megerősítettük a KEV jelenlétét a hazai *Ixodes ricinus* kullancsokban.
- Első ízben végeztünk sikerrel molekuláris szűrővizsgálatot a KEV jelenlétének igazolására rágcsálók körében.

- Kijelentettük, hogy a rágcsálók szűrése KEV kimutatása céljából hatékonyab volt, mint a növényzetről gyűjtött kullancsok monitorozása.
- Kijelentettük, hogy a kisemlősök rendszeres monitorozása jó prognosztikai adatokat szolgáltatna a KEV aktivitásról az ország endemikus régióin belül.

#### ❖ *Nyugat-nílusi vírus*

- Elsőként azonosítottuk (jelentős prevalenciával) a WNV 2-es genetikai variánsát *Culex pipiens* és *Anopheles maculipennis* szúnyogban Szerbia határmenti területein.
- Filogenetikai és molekuláris biológiai vizsgálatokkal megállapítottuk, hogy a Szerbiában jelenlévő törzs feltételezhetően Görögországból érkezhetett.
- Elemeztük a WNV törzsek teljes kódoló régióját, amelyek a 2013-as szerbiai WNV járvány ideje alatt mutattunk ki, így fontos adatokat kaptunk a törzs régiós szintű evolúciójával kapcsolatban.
- Azonosítottuk az NS3<sub>249</sub>P aminosavsztitúciót, amelyet korábban a megnövekedett neuropatogenitás potenciális markereként írtak le.
- Első ízben írtunk le párhuzamos mutációkat az NS3 fehérje helikáz domén és az NS4B TM fehérje között, amelyek befolyásolhatják a fehérje-fehérje kölcsönhatást, és ezáltal az NS3 fehérje RNS-kötődését, amely elősegítheti a vírusreplikációt.
- Leírtuk a WNV egy feltételezett új genetikai variánsát (WNV-9) hazánkban *Uranotaenia unguiculata* szúnyogfajból, rámutatva ezzel a faj potenciális vektor szerepére Európában.

#### ❖ *Usutu vírus*

- Elsőként írtuk le az USUV jelenétét Szerbiából származó *Culex pipiens* szúnyogban. Eddig csupán szerológiai adatok mutattak a vírus jelenlétére az országban.
- Meghatároztuk a vírus teljes kódoló régióját, elvégeztük a vírus molekuláris biológiai és filogenetikai jellemzését.
- Számos új mutációt azonosítottunk a vírus genomjában (C<sub>54</sub>L, E<sub>702</sub>A, NS1<sub>1240</sub>I, NS5<sub>2656</sub>R és NS5<sub>3257</sub>I), amelyek több régiót is érintettek.
- Első ízben bizonyítékot szolgáltatunk az USUV európai 1-es genetikai variáns földrajzi kiterjedésére a Balkán- félsziget déli területein.

## Denevérek hordozta vírusok jellemzése

### ❖ *Astrovírusok*

- Első ízben azonosítottunk denevérek által hordozott astrovírusokat hazánkban és végeztük el molekuláris jellemezésüket.
- Öt újabb, potenciálisan hordozó denevérfajt azonosítottunk a *Miniopterus schreibersii* faj dominanciájával.

### ❖ *Calicivírusok*

- Első ízben azonosítottunk denevérek által hordozott calicivírusokat hazánkban és végeztük el részletes molekuláris jellemezésüket.
- Részletes szerkezeti vizsgálatokat, valamint homológia modellezést készítettünk az új vírusok kapszidjával, a patogenitást *in silico* vizsgálatuk.

### ❖ *Koronavírusok*

- Első ízben azonosítottunk denevérek által hordozott koronavírusokat hazánkban (SARS-szerű  $\beta$ -koronavírusokat is) és végeztük el részletes molekuláris jellemezésüket.

### ❖ *Pikornavírusok*

- Első ízben azonosítottunk denevérek által hordozott új pikornavírust („Mischivirus B”) hazánkban és végeztük el molekuláris jellemezésüket.
- Genomszekvenálással meghatároztuk a virális genom organizációját, azonosítottuk a pikornavírus specifikus motívumokat, illetve analizáltuk az 5'UTR/IRES régiót.

### ❖ *Parvovírusok*

- Első ízben azonosítottunk denevérek által hordozott új parvovírust (denevér bufavírus) hazánkban és végeztük el molekuláris jellemezésüket.
- Genomszekvenálással meghatároztuk a virális genom organizációját, azonosítottuk a specifikus motívumokat. Potenciális rekombinációs eseményt tártunk fel, amely komoly jelentőséggel bírhat a Protoparvovírusok evolúciójában.

### ❖ *Fiovírusok*

- Első ízben mutattuk ki az egyetlen ezidáig ismert európai filovírust hazánkban (Európában másodszor) és végeztük el molekuláris jellemzését.
- A Lloviu vírusra specifikus TaqMan-PCR alapú tesztet fejlesztettünk ki, amely igen jelentős a vírus további kutatása céljából világszerte.

## JEGYZÉKEK

### Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Jakab F**, Horvath G, Ferenczi E, Sebok J, Varecza Z, Szucs G. Detection of Dobrava hantaviruses in Apodemus agrarius mice in the Transdanubian region of Hungary. VIRUS RESEARCH 128:(1-2) pp. 149-152. (2007) (Impakt faktor: **2,810**)
2. **Jakab F**, Sebok J, Ferenczi E, Horvath G, Szucs G. First detection of Dobrava hantavirus from a patient with severe haemorrhagic fever with renal syndrome by SYBR Green-based real time RT-PCR. SCANDINAVIAN JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES 39:(10) pp. 902-906. (2007) (Impakt faktor: **1,209**)
3. Maráczai A, Buda BL, Tóth GA, **Jakab F**. Hantavírus-fertőzések: történeti és klinikai kitekintés. BULLETIN OF MEDICAL SCIENCES / ORVOSTUDOMÁNYI ÉRTESÍTŐ 81:(4) pp. 232-235. (2008) (Impakt faktor: **0**)
4. **Jakab F**, Horvath G, Ferenczi E, Sebok J, Szucs G. First detection of Tula hantaviruses in Microtus arvalis voles in Hungary. ARCHIVES OF VIROLOGY 153:(11) pp. 2093-2096. (2008) (Impakt faktor: **2,020**)
5. Németh V, Madai M, Maráczai A, Bérczi B, Horváth Gy, Oldal M, Kisfali P, Bányai K, **Jakab F**. Detection of Dobrava-Belgrade hantavirus using recombinant-nucleocapsid-based enzyme-linked immunosorbent assay and SYBR Green-based real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. ARCHIVES OF VIROLOGY 156:(9) pp. 1655-1660. (2011) (Impakt faktor: **2,111**)
6. **Jakab F**, Sebok J, Szanto Z, Hang D, Imre M, Nemeth V, Madai M, Oldal M, Kovacs T, Wittmann I. Dobrava-Belgrade hantavirus infection mimics acute appendicitis. JOURNAL OF CLINICAL VIROLOGY 50:(2) pp. 164-166. (2011) (Impakt faktor: **3,969**)
7. Pintér R, Madai M, Vadkerti E, Németh V, Oldal M, Kemenesi G, Dallos B, Gyuranecz M, Kiss G, Bányai K, **Jakab F**. Identification of tick-borne encephalitis virus in ticks collected in southeastern Hungary. TICKS AND TICK-BORNE DISEASES 4:(5) pp. 427-431. (2013) (Impakt faktor: **2,878**)
8. Németh V, Oldal M, Madai M, Horváth Gy, Kemenesi G, Dallos B, Bányai K, **Jakab F**. Molecular characterization of Dobrava and Kurkino genotypes of Dobrava-Belgrade hantavirus detected in Hungary and Northern Croatia. VIRUS GENES 47:(3) pp. 546-549. (2013) (Impakt faktor: **1,837**)

9. Németh V, Oldal M, Egyed L, Gyuranecz M, Erdélyi K, Kvell K, Kalvatchev N, Zeller H, Bányai K, **Jakab F**. Serologic evidence of crimean-congo hemorrhagic Fever virus infection in Hungary. VECTOR-BORNE AND ZOONOTIC DISEASES 13:(4) pp. 270-272. (2013) (Impakt faktor: **2,531**)
10. Klempa B, Avsic-Zupanc T, Clement J, Dzagurova TK, Henttonen H, Heyman P, **Jakab F**, Kruger DH, Maes P, Papa A, Tkachenko EA, Ulrich RG, Vapalahti O, Vaheri A. Complex evolution and epidemiology of Dobrava-Belgrade hantavirus: implications for taxonomy. ARCHIVES OF VIROLOGY 158:(3) pp. 521-529. (2013) (Impakt faktor: **2,282**)
11. Szentpáli-Gavallér K, Antal L, Tóth M, Kemenesi G, Soltész Z, Dán Á, Erdélyi K, Bányai K, Bálint Á, **Jakab F**, Bakonyi T. Monitoring of West Nile virus in mosquitoes between 2011-2012 in Hungary. VECTOR-BORNE AND ZOONOTIC DISEASES 14:(9) pp. 648-655. (2014) (Impakt faktor: **2,298**)
12. Pintér R, Madai M, Horváth Gy, Németh V, Oldal M, Kemenesi G, Dallos B, Bányai K, **Jakab F**. Molecular detection and phylogenetic analysis of tick-borne encephalitis virus in rodents captured in the Transdanubian region of Hungary. VECTOR-BORNE AND ZOONOTIC DISEASES 14:(8) pp. 621-624. (2014) (Impakt faktor: **2,298**)
13. Oldal M, Németh V, Madai M, Pintér R, Kemenesi G, Dallos B, Kutas A, Sebők J, Horváth Gy, Bányai K, **Jakab F**. Serosurvey of pathogenic hantaviruses among forestry workers in Hungary. INTERNATIONAL JOURNAL OF OCCUPATIONAL MEDICINE AND ENVIRONMENTAL HEALTH 27:(5) pp. 766-773. (2014) (Impakt faktor: **0,695**)
14. Oldal M, Németh V, Madai M, Kemenesi G, Dallos B, Péterfi Z, Sebők J, Wittmann I, Bányai K, **Jakab F**. Identification of hantavirus infection by Western blot assay and TaqMan PCR in patients hospitalized with acute kidney injury. DIAGNOSTIC MICROBIOLOGY AND INFECTIOUS DISEASE 79:(2) pp. 166-170. (2014) (Impakt faktor: **2,457**)
15. Németh V, Oldal M, Sebők J, Wittmann I, **Jakab F**. Hantavírus fertőzések hazai jelentősége a legújabb virológiai, epidemiológiai és klinikai vizsgálatok eredményeinek tükrében. HYPERTONIA ÉS NEPHROLOGIA 18:(3-4) pp. 76-81. (2014) (Impakt faktor: **0**)
16. Kemenesi G, Dallos B, Görföl T, Boldogh S, Estók P, Kurucz K, Kutas A, Földes F, Oldal M, Németh V, Martella V, Bányai K, **Jakab F**. Molecular survey of RNA viruses in Hungarian bats: discovering novel astroviruses, coronaviruses and caliciviruses.

- VECTOR-BORNE AND ZOONOTIC DISEASES 14:(12) pp. 846-855. (2014) (Impakt faktor: **2,298**)
17. Kemenesi G, Dallos B, Oldal M, Kutas A, Földes F, Németh V, Reiter P, Bakonyi T, Bányai K, **Jakab F.** Putative novel lineage of West Nile virus in *Uranotaenia unguiculata* mosquito, Hungary. VIRUSDISEASE 25:(4) pp. 500-503. (2014) (Impakt faktor: **0**)
  18. Kemenesi G, Krtinić B, Milankov V, Kutas A, Dallos B, Oldal M, Somogyi N, Németh V, Bányai K, **Jakab F.** West Nile virus surveillance in mosquitoes, April to October 2013, Vojvodina province, Serbia: implications for the 2014 season. EUROSURVEILLANCE 19:(16) Paper 20779. 5 p. (2014) (Impakt faktor: **5,722**)
  19. Kemenesi G, Dallos B, Görföl T, Boldog S, Estók P, Kurucz K, Oldal M, Németh V, Madai M, Bányai K, **Jakab F.** Novel European lineages of bat astroviruses identified in Hungary. ACTA VIROLOGICA 58:(1) pp. 95-98. (2014) (Impakt faktor: **1,280**)
  20. Kemenesi G, Dallos B, Görföl T, Estók P, Boldogh S, Kurucz K, Oldal M, Marton S, Bányai K, **Jakab F.** Genetic diversity and recombination within bufaviruses: detection of a novel strain in Hungarian bats. INFECTION GENETICS AND EVOLUTION 33: pp. 288-292. (2015) (Impakt faktor: **2,591**)
  21. Kemenesi G, Zhang D, Marton S, Dallos B, Görföl T, Estók P, Boldogh S, Kurucz K, Oldal M, Kutas A, Bányai K, **Jakab F.** Genetic characterization of a novel picornavirus detected in *Miniopterus schreibersii* bats. JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY 96:(4) pp. 815-821. (2015) (Impakt faktor: **3,192**)
  22. Görföl T, Kemenesi G, **Jakab F.** A denevérek által terjesztett vírusok változatossága a hazai denevér populációkban [High diversity of bat-related viruses in Hungary]. MAGYAR ÁLLATORVOSOK LAPJA 137:(11) pp. 679-686. (2015) (Impakt faktor: **0,212**)
  23. Zana B, Kemenesi G, Herczeg R, Dallos B, Oldal M, Marton Sz, Krtinac B, Gellért Á, Bányai K, **Jakab F.** Genomic characterization of West Nile virus strains derived from mosquito samples obtained during 2013 Serbian outbreak. JOURNAL OF VECTOR BORNE DISEASES 53:(4) pp. 379-383. (2016) (Impakt faktor: **1,190**)
  24. Kemenesi G, Gellért Á, Dallos B, Görföl T, Boldogh S, Estók P, Marton S, Oldal M, Martella V, Bányai K, **Jakab F.** Sequencing and molecular modeling identifies candidate members of Caliciviridae family in bats. INFECTION GENETICS AND EVOLUTION 41: pp. 227-232. (2016) (Impakt faktor: **2,885**)

25. Kurucz K, Kemenesi G, Zana B, Zeghib S, Oldal M, **Jakab F**. Ecological preferences of the putative West Nile virus vector *Uranotaenia unguiculata* mosquito with description of an original larval habitat. NORTH-WESTERN JOURNAL OF ZOOLOGY e161103:(1) p. 1. (2017) (Impakt faktor: **0,596**)
26. Kurucz K, Madai M, Bali D, Hederics D, Horváth Gy, Kemenesi G, **Jakab F**. Parallel survey of two widespread renal syndrome-causing zoonoses: *Leptospira* spp. and Hantavirus in urban environment, Hungary. VECTOR-BORNE AND ZOONOTIC DISEASES 18:(4) pp. 200-205. (2018) (Impakt faktor: **2.171**)
27. Kemenesi G, Kurucz K, Dallos B, Zana B, Földes F, Boldogh S, Görföl T, Carroll WM, **Jakab F**. Re-emergence of Lloviu virus in *Miniopterus schreibersii* bats, Hungary, 2016. EMERGING MICROBES & INFECTIONS 7: Paper 66. 4 p. (2018) (Impakt faktor: **6,032**)
28. Kemenesi G, Buzás D, Zana B, Kurucz K, Krtinac B, Kepner A, Földes F, **Jakab F**. First genetic characterization of Usutu virus from *Culex pipiens* mosquitoes Serbia, 2014. INFECTION GENETICS AND EVOLUTION 63: pp. 58-61. (2018) (Impakt faktor: **2,545**)

#### Egyéb közlemények

1. **Jakab F**, Walter J, Szűcs Gy. A humán astrovírusok jelentősége a gyermekkori gastroenteritisekben. INFEKTOLÓGIA ÉS KLINIKAI MIKROBIOLÓGIA 8:(3) pp. 118-122. (2001) (Impakt faktor: **0**)
2. **Jakab F**, Tímár L, Szűcs Gy. A humán astrovírusok okozta gastroenteritisek jellemzői és klinikuma kórházban ápoltságban gyermekek körében. GYERMEKGYÓGYÁSZAT 53:(4) pp. 419-425. (2002) (Impakt faktor: **0**)
3. van Kooij A, Middel J, **Jakab F**, Elfferich P, Koedijk DG, Feijlbrief M, Scheffer AJ, Degener JE, The TH, Scheek RM, Welling GW, Welling-Wester S. High level expression and secretion of truncated forms of herpes simplex virus type 1 and type 2 glycoprotein D by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION 25:(3) pp. 400-408. (2002) (Impakt faktor: **1.375**)
4. Bányai K, **Jakab F**, Reuter G, Bene J, Új M, Melegh B, Szűcs Gy. Sequence heterogeneity among human picobirnaviruses detected in a gastroenteritis outbreak. ARCHIVES OF VIROLOGY 148:(12) pp. 2281-2291. (2003) (Impakt faktor: **1.876**)
5. **Jakab F**, Walter JE, Berke T, Matson DO, Mitchell DK, Szucs Gy. Molecular characterization and sequence analysis of human astroviruses circulating in Hungary.

- FEMS IMMUNOLOGY AND MEDICAL MICROBIOLOGY 39:(2) pp. 97-102. (2003) (Impakt faktor: **1.789**)
6. Bányai K, Gentsch JR, Schipp R, **Jakab F**, Bene J, Melegh B, Glass RI, Szűcs Gy. Molecular epidemiology of human P[8],G9 rotaviruses in Hungary between 1998 and 2001. JOURNAL OF MEDICAL MICROBIOLOGY 53:(8) pp. 791-801. (2004) (Impakt faktor: **2.484**)
  7. Bányai K, Martella V, **Jakab F**, Melegh B, Szűcs Gy. Sequencing and phylogenetic analysis of human genotype P[6] rotavirus strains detected in Hungary provides evidence for genetic heterogeneity within the P[6] VP4 gene. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY 42:(9) pp. 4338-4343. (2004) (Impakt faktor: **3.439**)
  8. **Jakab F**, Meleg E, Bányai K, Melegh B, Tímár L, Péterfai J, Szűcs Gy. One year survey of astrovirus infection in children with gastroenteritis in a large hospital in Hungary – Occurrence and genetic analysis of astroviruses. JOURNAL OF MEDICAL VIROLOGY 74:(1) pp. 71-77. (2004) (Impakt faktor: **2.331**)
  9. Bányai K, Gentsch JR, Schipp R, **Jakab F**, Meleg E, Mihály I, Szűcs Gy. Dominating prevalence of P[8],G1 and P[8],G9 rotavirus strains among children admitted to hospital between 2000 and 2003 in Budapest, Hungary. JOURNAL OF MEDICAL VIROLOGY 76: pp. 414-423. (2005) (Impakt faktor: **2.520**)
  10. **Jakab F**, Péterfai J, Meleg E, Bányai K, Mitchell DK, Szűcs Gy. Comparison of clinical characteristics between astrovirus and rotavirus infections diagnosed in 1997 to 2002 in Hungary. ACTA PAEDIATRICA 94: pp. 667-671. (2005) (Impakt faktor: **1.277**)
  11. Meleg E, **Jakab F**, Kocsis B, Bányai K, Melegh B, Szűcs Gy. Human astrovírusok első kimutatása nyers szennyvízből Magyarországon. EGÉSZSÉGTUDOMÁNY 49: pp. 318-327. (2005) (Impakt faktor: **0**)
  12. Bányai K, Jiang B, Bogdán Á, Horváth B, **Jakab F**, Meleg E, Martella V, Magyari L, Melegh B, Szűcs Gy. Prevalence and molecular characterization of human group C rotaviruses in Hungary. JOURNAL OF CLINICAL VIROLOGY 37:(4) pp. 317-322. (2006) (Impakt faktor: **2.630**)
  13. Meleg E, **Jakab F**, Kocsis B, Bányai K, Melegh B, Szűcs Gy. Human astroviruses in raw sewage samples in Hungary. JOURNAL OF APPLIED MICROBIOLOGY 101:(5) pp. 1123-1129. (2006) (Impakt faktor: **2.206**)
  14. Zhang Z, Mitchell DK, Afflerbach C, **Jakab F**, Walter J, Zhang YJ, Staat MA, Azimi P, Matson DO. Quantitation of human astrovirus by real-time reverse-transcription-



- polymerase chain reaction to examine correlation with clinical illness. JOURNAL OF VIROLOGICAL METHODS 134:(1-2) pp. 190-196. (2006) (Impakt faktor: **2.097**)
15. **Jakab F**, Péterfai J, Verebély T, Meleg E, Bányai K, Mitchell DK, Szűcs Gy. Human astrovirus infection associated with childhood intussusception. PEDIATRICS INTERNATIONAL 49: pp. 103-105. (2007) (Impakt faktor: **0.737**)
  16. Bányai K, Martella V, Bogdán Á, Forgách P, **Jakab F**, Meleg E, Bíró H, Meleg B, Szűcs Gy. Genogroup I picobirnaviruses in pigs: evidence for genetic diversity and relatedness to human strains. JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY 89: pp. 534-539. (2008) (Impakt faktor: **3.092**)
  17. László B, Kónya J, Dandár E, Deák J, Farkas Á, Gray J, Grósz G, Iturriza-Gomara M, **Jakab F**, Juhász Á, Kisfali P, Kovács J, Lengyel Gy, Martella V, Meleg B, Mészáros J, Molnár P, Nyúl Z, Papp H, Pátri L, Puskás E, Sántha I, Schneider F, Szomor K, Tóth A, Tóth E, Szűcs Gy, Bányai K. Surveillance of human rotaviruses in 2007-2011, Hungary: exploring the genetic relatedness between vaccine and field strains. JOURNAL OF CLINICAL VIROLOGY 55:(2) pp. 140-146. (2012) (Impakt faktor: **3.287**)
  18. Midgley SE, Bányai K, Buesa J, Halaihel N, Hjulsager CK, **Jakab F**, Kaplon J, Larsen LE, Monini M, Poljšak-Prijatelj M, Pothier P, Ruggeri FM, Steyer A, Koopmans M, Böttiger B. Diversity and zoonotic potential of rotaviruses in swine and cattle across Europe. VETERINARY MICROBIOLOGY 156:(3-4) pp. 238-245. (2012) (Impakt faktor: **3.127**)
  19. Ganesh B, Bányai K, Martella V, **Jakab F**, Masachessi G, Kobayashi N. Picobirnavirus infections: viral persistence and zoonotic potential. REVIEWS IN MEDICAL VIROLOGY 22:(4) pp. 245-256. (2012) (Impakt faktor: **7.615**)
  20. Papp H, Al-Mutairi LZ, Chehadeh W, Farkas LS, Lengyel Gy, **Jakab F**, Martella V, Szűcs Gy, Bányai K. Novel NSP4 genotype in a camel G10P[15] rotavirus strain. ACTA MICROBIOLOGICA ET IMMUNOLOGICA HUNGARICA 59:(3) pp. 411-421. (2012) (Impakt faktor: **0.646**)
  21. Papp H, László B, **Jakab F**, Ganesh B, De Grazia S, Matthijnsens J, Ciarlet M, Martella V, Bányai K. Review of group A rotavirus strains reported in swine and cattle. VETERINARY MICROBIOLOGY 165:(3-4) pp. 190-199. (2013) (Impakt faktor: **2.726**)
  22. Papp H, Borzák R, Farkas S, Kisfali P, Lengyel G, Molnár P, Meleg B, Matthijnsens J, **Jakab F**, Martella V, Bányai K. Zoonotic transmission of reassortant porcine G4P[6]

rotaviruses in Hungarian pediatric patients identified sporadically over a 15 year period. INFECTION GENETICS AND EVOLUTION 19: pp. 71-80. (2013) (Impakt faktor: **3.264**)

23. Papp H, Malik YS, Farkas SL, **Jakab F**, Martella V, Bányai K. Rotavirus strains in neglected animal species including lambs, goats and camelids. VIRUSDISEASE 25:(2) pp. 215-222. (2014) (Impakt faktor: **0**)
24. Banyai K, Borzak R, Ihasz K, Feher E, Dan A, **Jakab F**, Papp T, Hetzel U, Marschang RE, Farkas SL. Whole-genome sequencing of a green bush viper reovirus reveals a shared evolutionary history between reptilian and unusual mammalian orthoreoviruses. ARCHIVES OF VIROLOGY 159: pp. 153-158. (2014) (Impakt faktor: **2.390**)
25. Dandár E, Farkas SL, Marton S, Oldal M, **Jakab F**, Mató T, Palya V, Bányai K. The complete genome sequence of a European goose reovirus strain. ARCHIVES OF VIROLOGY 159: pp. 2165-2169. (2014) (Impakt faktor: **2.390**)
26. Fehér E, Pazár P, Kovács E, Farkas SL, Lengyel G, **Jakab F**, Martella V, Bányai K. Molecular detection and characterization of human gyroviruses identified in the ferret fecal virome. ARCHIVES OF VIROLOGY 159:(12) pp. 3401-3406. (2014) (Impakt faktor: **2.390**)
27. Martella V, Pinto P, Tummolo F, De Grazia S, Giammanco GM, Medici MC, Ganesh B, L'Homme Y, Farkas T, **Jakab F**, Bányai K. Analysis of the ORF2 of human astroviruses reveals lineage diversification, recombination and rearrangement and provides the basis for a novel sub-classification system. ARCHIVES OF VIROLOGY 159: pp. 3185-3196. (2014) (Impakt faktor: **2.390**)
28. Mihalov-Kovács E, Marton S, Fehér E, Lengyel G, **Jakab F**, Tuboly T, Bányai K. Enterális vírushatások menhelyi kutyákban Magyarországon: Enteric viral infections of sheltered dogs in Hungary. MAGYAR ÁLLATORVOSOK LAPJA 136: pp. 661-670. (2014) (Impakt faktor: **0.185**)
29. Papp H, Marton S, Farkas SL, **Jakab F**, Martella V, Malik YS, Palya V, Bányai K. Classification and characterization of a laboratory chicken rotavirus strain carrying G7P[35] neutralization antigens on the genotype 4 backbone gene configuration. BIOLOGICALS 42:(6) pp. 299-304. (2014) (Impakt faktor: **1.209**)
30. Papp H, Rigó D, Dán Á, Farkas SL, Oldal M, **Jakab F**, Bányai K. Szokatlan rotavírus antigén kombináció azonosítása fiatal fécében. MAGYAR ÁLLATORVOSOK LAPJA 136: pp. 729-735. (2014) (Impakt faktor: **0.185**)

31. Dóró R, Mihalov-Kovács E, Marton S, László B, Deák J, **Jakab F**, Juhász Á, Kisfali P, Martella V, Melegh B, Molnár P, Sántha I, Schneider F, Bányai K. Large-scale whole genome sequencing identifies country-wide spread of an emerging G9P[8] rotavirus strain in Hungary, 2012. *INFECTION GENETICS AND EVOLUTION* 28: pp. 495-512. (2014) (Impakt faktor: **3.015**)
32. Dandár E, Huhtamo E, Farkas SL, Oldal M, **Jakab F**, Vapalahti O, Bányai K. Complete genome analysis identifies Tvärminne avian virus as a candidate new species within the genus Orthoreovirus. *JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY* 95: pp. 898-904. (2014) (Impakt faktor: **3.183**)
33. Farkas SL, Dandár E, Marton S, Fehér E, Oldal M, **Jakab F**, Mató T, Palya V, Bányai K. Detection of shared genes among Asian and European waterfowl reoviruses in the whole genome constellations. *INFECTION GENETICS AND EVOLUTION* 28: pp. 55-57. (2014) (Impakt faktor: **3.015**)
34. Farkas SL, Ihász K, Fehér E, Bartha D, **Jakab F**, Gál J, Bányai K, Marschang RE. Sequencing and phylogenetic analysis identifies candidate members of new picornavirus genus in terrestrial tortoise species. *ARCHIVES OF VIROLOGY* 160: pp. 811-816. (2015) (Impakt faktor: **2.255**)
35. Kemenesi G, Kurucz K, Kepner A, Dallos B, Oldal M, Herczeg R, Vajdovich P, Bányai K, **Jakab F**. Circulation of *Dirofilaria repens*, *Setaria tundra*, and *Onchocercidae* species in Hungary during the period 2011-2013. *VETERINARY PARASITOLOGY* 214:(1-2) pp. 108-113. (2015) (Impakt faktor: **2.242**)
36. Marton S, Bányai K, Gál J, Ihász K, Kugler R, Lengyel G, **Jakab F**, Bakonyi T, Farkas SL. Coding-complete sequencing classifies parrot bornavirus 5 into a novel virus species. *ARCHIVES OF VIROLOGY* 160:(11) pp. 2763-2768. (2015) (Impakt faktor: **2.255**)
37. Oldal M, Sironen T, Henttonen H, Vapalahti O, Madai M, Horváth Gy, Dallos B, Kutas A, Földes F, Kemenesi G, Németh V, Bányai K, **Jakab F**. Serologic survey of orthopoxvirus infection among rodents in Hungary. *VECTOR-BORNE AND ZOONOTIC DISEASES* 15:(5) pp. 317-322. (2015) (Impakt faktor: **1.956**)
38. Melegh S, Schneider Gy, Horváth M, **Jakab F**, Emődy L, Tigyi Z. Identification and characterization of CTX-M-15 producing *Klebsiella pneumoniae* clone ST101 in a Hungarian university teaching hospital. *ACTA MICROBIOLOGICA ET IMMUNOLOGICA HUNGARICA* 62:(3) pp. 233-245. (2015) (Impakt faktor: **0.568**)

39. Marton S, Mihalov-Kovács E, Dóró R, Csata T, Fehér E, Oldal M, **Jakab F**, Matthijnssens J, Martella V, Bányai K. Canine Rotavirus C strain detected in Hungary shows marked genotype diversity. *JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY* 96: pp. 3059-3071. (2015) (Impakt fator: **3.192**)
40. Mihalov-Kovács E, Gellért Á, Marton S, Farkas SL, Fehér E, Oldal M, **Jakab F**, Martella V, Bányai K. Candidate new rotavirus species in sheltered dogs, Hungary. *EMERGING INFECTIOUS DISEASES* 21: pp. 660-663. (2015) (Impakt fator: **6.994**)
41. Antal L, László B, Kotlík P, Mozsár A, Czeglédi I, Oldal M, Kemenesi G, **Jakab F**, Nagy S. A Phylogenetic evidence for a new species of *Barbus* in the Danube River basin. *MOLECULAR PHYLOGENETICS AND EVOLUTION* 96: pp. 187-194. (2016) (Impakt faktor: **4.419**)
42. Dóró R, Marton S, Bartókné Horváth A, Lengyel G, Agócs Z, **Jakab F**, Bányai K. Equine-like G3 rotavirus in Hungary, 2015 - is it a novel intergenogroup reassortant pandemic strain? *ACTA MICROBIOLOGICA ET IMMUNOLOGICA HUNGARICA* 63: pp. 243-255. (2016) (Impakt faktor: **0.921**)
43. Farkas SL, Marton S, Dandár E, Kugler R, Gál B, **Jakab F**, Bálint Á, Kecskeméti S, Bányai K. Lineage diversification, homo- and heterologous reassortment and recombination shape the evolution of chicken orthoreoviruses. *SCIENTIFIC REPORTS* 6: Paper 36960. (2016) (Impakt faktor: **4.259**)
44. Francuski L, Milankov V, Ludoski J, Krtinic B, Lundström J, Kemenesi G, **Jakab F**. Genetic and phenotypic variation in central and northern European populations of *Aedes* (*Aedimorphus*) *vexans* (Meigen, 1830) (Diptera, Culicidae). *JOURNAL OF VECTOR ECOLOGY* 41:(1) pp. 160-171. (2016) (Impakt faktor: **1.473**)
45. Gál J, Marton S, Ihász K, Papp H, **Jakab F**, Malik YS, Bányai K, Farkas SL. Complete genome sequence of a genotype G23P[37] pheasant rotavirus strain identified in Hungary. *GENOME ANNOUNCEMENTS* 4:(2) Paper e00119-16. (2016) (Impakt faktor: **0**)
46. Kemenesi G, Földes F, Zana B, Kurucz K, Estók P, Boldogh S, Görföl T, Bányai K, Oldal M, **Jakab F**. Genetic Characterization of Providence virus isolated in bat guano, Hungary. *GENOME ANNOUNCEMENTS* 4:(3) Paper e00403-16. (2016) (Impakt faktor: **0**)
47. Kurucz K, Kiss V, Zana B, Schmieder V, Kepner A, **Jakab F**, Kemenesi G. Emergence of *Aedes koreicus* (Diptera: Culicidae) in an urban area, Hungary, 2016. *PARASITOLOGY RESEARCH* 115:(12) pp. 4687-4689. (2016) (Impakt faktor: **2,329**)

48. Kugler R, Marschang RE, Ihász K, Lengyel G, **Jakab F**, Bányai K, Farkas SL. Whole genome characterization of a chelonian orthoreovirus strain identifies significant genetic diversity and may classify reptile orthoreoviruses into distinct species. *VIRUS RESEARCH* 215: pp. 94-98. (2016) (Impakt faktor: **2.628**)
49. Damásdi M, **Jakab F**, Kovács K, Oldal M, Kemenesi G, Szabó E, Vályi-Nagy I, Pytel Á, Farkas L, Szántó Á. Prevalence and type diversity of human papillomaviruses in penile cancers in Hungary. *PATHOLOGY AND ONCOLOGY RESEARCH* 22:(3) pp. 643-646. (2016) (Impakt faktor: **1.736**)
50. Kugler R, Dandár E, Fehér E, **Jakab F**, Mató T, Palya V, Bányai K, Farkas LS. Phylogenetic analysis of a novel reassortant orthoreovirus strain detected in partridge (*Perdix perdix*). *VIRUS RESEARCH* 215: pp. 99-103. (2016) (Impakt faktor: **2.628**)
51. Kurucz K, Kepner A, Krtinic B, Zana B, Földes F, Bányai K, Oldal M, **Jakab F**, Kemenesi G. First molecular identification of *Dirofilaria* spp. (Onchocercidae) in mosquitoes from Serbia. *PARASITOLOGY RESEARCH* 115:(8) pp. 3257-3260. (2016) (Impakt faktor: **2.329**)
52. Bányai K, Kemenesi G, Budinski I, Földes F, Zana B, Marton S, Kugler R, Oldal M, Kurucz K, **Jakab F**. Candidate new rotavirus species in Schreiber's bats, Serbia. *INFECTION GENETICS AND EVOLUTION* 48: pp. 19-26. (2017) (Impakt faktor: **2.545**)
53. Damasdi M, Kovacs K, Farkas N, **Jakab F**, Kovacs G. Down-regulation of Toll-like Receptor TLR4 Is Associated with HPV DNA Integration in Penile Carcinoma. *ANTICANCER RESEARCH* 37:(10) pp. 5515-5519. (2017) (Impakt faktor: **1.865**)
54. Fehér E, Kemenesi G, Oldal M, Kurucz K, Kugler R, Farkas SL, Marton S, Horváth G, Bányai K, **Jakab F**. Isolation and complete genome characterization of novel reassortant orthoreovirus from common vole (*Microtus arvalis*). *VIRUS GENES* 53:(2) pp. 307-311. (2017) (Impakt faktor: **1.542**)
55. Kemenesi G, Kurucz K, Zana B, Tu VT, Görföl T, Estók P, Földes F, Sztancsik K, Urbán P, Fehér E, **Jakab F**. Highly divergent cyclo-like virus in a great roundleaf bat (*Hipposideros armiger*), Vietnam. *ARCHIVES OF VIROLOGY* 162:(8) pp. 2403-2407. (2017) (Impakt faktor: **2.160**)
56. Mihalov-Kovács E, Martella V, Lanave G, Bodnar L, Fehér E, Marton S, Kemenesi G, **Jakab F**, Bányai K. Genome analysis of canine astroviruses reveals genetic heterogeneity and suggests possible inter-species transmission. *VIRUS RESEARCH* 232: pp. 162-170. (2017) (Impakt faktor: **2.484**)

57. Zana B, Kemenesi G, Antal L, Földes F, Oldal M, Bányai K, **Jakab F**. Molecular traces of a putative novel insect flavivirus from *Anopheles hyrcanus* mosquito species in Hungary. *ACTA VIROLOGICA* 61:(1) pp. 127-129. (2017) (Impakt faktor: **0.696**)
58. Kemenesi G, Kurucz K, Zana B, Földes F, Urbán P, Vlaschenko A, Kravchenko K, Budinski I, Szodoray-Parádi F, Bücs Sz, Jére Cs, Csősz I, Szodoray-Parádi A, Estók P, Görföl T, Boldogh S, **Jakab F**. Diverse replication-associated protein encoding circular DNA viruses in guano samples of Central-Eastern European bats. *ARCHIVES OF VIROLOGY* 163:(3) pp. 671-678. (2018) (Impakt faktor: **2.160**)
59. Kurucz K, Kiss V, Zana B, **Jakab F**, Kemenesi G. Filarial nematode (Order: Spirurida) surveillance in urban habitats, in the city of Pécs (Hungary). *PARASITOLOGY RESEARCH* 117:(10) pp. 3355-3360. (2018) (Impakt faktor: **2.558**)
60. Zana B, Kemenesi G, Urbán P, Földes F, Görföl T, Estók P, Boldogh S, Kurucz K, **Jakab F**. Metagenomic analysis of bat guano samples revealed the presence of viruses potentially carried by insects, among others by *Apis mellifera* in Hungary. *ACTA VETERINARIA HUNGARICA* 66:(1) pp. 151-161. (2018) (Impakt faktor: **1.042**)

## Könyvfejezetek

1. Reuter G, **Jakab F**, Bányai K, Szűcs Gy. Gasztroenteritist okozó vírusok. Humán astrovírusok. Humán enterális adenovírusok. Humán calicivírusok (norovírusok, sapovírusok). Rotavírusok. Feltételezetten gastroenteritist okozó egyéb vírusok. In: Berencsi György (szerk.), *Orvosi molekuláris virológia*. 393 p.; Budapest: Convention Budapest Kft., 2005. pp. 22-39. (ISBN: 9789639740204)
2. Meleg E, **Jakab F**. Astroviruses. In: Dong You Liu (szerk.), *Molecular detection of foodborne pathogenes*. 905 p.; Boca Raton (FL): CRC Press - Taylor and Francis Group, 2010. pp. 33-48. (ISBN: 9781420076431)
3. **Jakab F**. Bunyaviridae. In: Takács Mária, Kárpáti Judit (szerk.), *Klinikai és járványügyi virológia*. 872 p.; Budapest: Vox Medica Kiadói Kft., 2011. pp. 225-232. (ISBN: 9789639740204)
4. **Jakab F**. Filovírusok. In: Pál Tibor (szerk.), *Az orvosi mikrobiológia tankönyve*. 544 p.; Budapest: Medicina Könyvk. Zrt., 2013. pp. 221-223. (ISBN: 9789632264639)
5. **Jakab F**. Bunyavírusok. In: Pál Tibor (szerk.), *Az orvosi mikrobiológia tankönyve*. 544 p.; Budapest: Medicina Könyvkiadó Zrt., 2013. pp. 228-231. (ISBN: 9789632264639)
6. **Jakab F**. Arenavírusok. In: Pál Tibor (szerk.), *Az orvosi mikrobiológia tankönyve*. 544 p.; Budapest: Medicina Könyvk. Zrt., 2013. pp. 231-233. (ISBN: 9789632264639)

## **Scientometria**

(MTA VIII. Biológiai Tudományok Osztálya, 2018. október 09.)

- Az összes közlemény összesített impakt faktora: **188,2**
  - PhD fokozat megszerzése előtti közlemények impakt faktora: **17,1**
  - PhD fokozat megszerzése utáni közlemények impakt faktora: **171,1**
  - Első és utolsó szerzős közlemények impakt faktora: **77,5**
- Idézettség:
  - Összes idézetek száma: **1284**
  - Független idézetek száma: **934**
- Hirsch index: **20**

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném megköszönni Dr. Szűcs György Főorvos Úrnak, hogy lehetőséget adott számomra a laboratóriumi munkára, szakmai támogatásával segítette tanulásomat, elindított kutatói pályámon és témavezetésével doktori fokozatot szerezhettem.

Köszönetemet fejezem ki a külföldön végzett tudományos munkámban segítő mentoraimnak, feletteseimnek és barátaimnak: Dr. Sytske Welling-Wester, Matty Feijlbrief, Danny G.A.M. Koedijk (Groningen, Hollandia), Dr. Walter E. Jolán, Dr. Douglas K. Mitchell, Dr. David O. Matson (Virginia, USA).

Köszönettel tartozom Dr. Gábrriel Róbert Professzor Úrnak, hogy 2007-ben lehetőséget adott számomra, hogy újra a Pécsi Tudományegyetem, Természettudományi Karának munkatársa lehessenek, szakmailag, erkölcsileg és emberileg maximálisan támogatott. Köszönöm Dr. Putnoky Péter Professzor Úrnak, a Genetikai és Molekuláris Biológiai Tanszék munkatársainak, hogy befogadtak a tanszékre és hasznos tanácsaikkal segítettek eligazodni az egyetem „útvesztőiben”.

Köszönöm Dr. Kovács L. Gábor Professzor Úrnak, Dr. Helyes Zsuzsanna Professzor Asszonynak, Végh Tamara Igazgató Asszonynak és Czibók Balázs Menedzser Úrnak, hogy a PTE, Szentágothai János Kutatóközpont kutatói közé fogadtak, munkámat, terveimet önzetlenül támogatták.

Köszönettel tartozom a hazai és nemzetközi Kollégáknak, akikkel kutatásainkat, tudományos terveinket megvalósítottuk. Név szerint: Dr. Ferenczi Emőke, Prof. Dr. Wittmann István, Dr. Sebők Judit, Dr. Péterfi Zoltán, Dr. Horváth Győző, Dr. Gyuranecz Miklós, Dr. Gellért Ákos, Dr. Bakonyi Tamás, Dr. Csorba Gábor, Dr. Görföl Tamás, Dr. Boldogh Sándor, Dr. Estók Péter, Dr. Kvell Krisztián, Dr. Herve Zeller, Dr. Nikolay Kalvatchev, Dr. Caroll Miles, Dr. Sylvain Baize, Dr. Vesna Milankov, Dr. Bosiljka Krtinic.

A legnagyobb köszönet mégis azoknak az embereknek szól, akik az elmúlt 12 évben ott álltak mellettem, akik a kezdetektől velem voltak, és akikkel felépítettük mindazt, amire ma mindannyian büszkék lehetünk. Köszönöm Nektek: Dr. Németh Viktória, Madai Mónika, Dr. Oldal Miklós, Dr. Kemenesi Gábor, Dr. Bányai Krisztián, Dr. Kurucz Kornélia, Zana Brigitta, Földes Fanni, Dallos Bianka, Pintér Réka, Búzás Dóra, Papp Henrietta, Zeghibib Safia.

Végül, de nem utolsó sorban, hálásan köszönöm szüleimnek a támogatást, a biztatás és azt, hogy hittek bennem. Köszönöm feleségemnek, Magyar Veronikának, hogy odaadó, önzetlen párként mindig mögöttem állt, gyermekeimnek Jakab Ferenc Péternek és Jakab Anna Veronikának, hogy mosolyukkal és szeretetükkel erőt adtak a mindennapokban és átsegítettek a nehézségeken.